



Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Evolution temporelle des processus inflammatoires et oxydatifs secondaires à l'ischémie-reperfusion rénale chez le rat

Hubert, Virginie

Award date:
2010

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Evolution temporelle des processus inflammatoires et oxydatifs
secondaires à l'ischémie-reperfusion rénale chez le rat**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**

Virginie HUBERT

Janvier 2010

Remerciements

C'est avec un grand plaisir que je réserve ces lignes en signe de reconnaissance à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, chacun à leur manière en m'apportant sa connaissance, son aide ou son soutien moral ou affectif. Je remercie à l'avance ceux dont le nom n'apparaîtrait pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre dans la réalisation de ce travail.

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Nathalie Caron, non seulement pour l'accueil dans son laboratoire mais également pour tous ses conseils, sa rigueur scientifique et son aide apportée. Merci pour cette compréhension et ce soutien reçus, et surtout merci pour cette contribution décisive apportée à l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens aussi à remercier les 4 filles du labo pour l'aide apportée mais aussi pour l'ambiance chaleureuse et l'aspect humain qu'elles apportent au laboratoire.

Virginie qui m'a aidée et soutenue tout au long de ce mémoire même dans les moments plus difficile, souvent même au dépens de son propre travail. Merci d'avoir été si disponible et surtout merci de m'avoir si bien encadrée, soutenue et rassurée même quand tu stressais autant que moi.

Isa, merci pour ton sens du travail et du sérieux mais aussi pour ton côté bon vivant et tous les délires partagés. Où que j'aille, je veillerai à bien trier les poubelles !

Laetitia, toujours disponible pour aider, donner un conseil ou rassurer avant les remises.

Et Vanessa et Bénédicte, mémorantes avec lesquelles j'ai partagé cette expérience. Tout simplement merci pour tous ces bons et moins bons moments passés ensemble et surtout merci de m'avoir encouragé dans ce choix de mémoire.

J'adresse mes remerciements à Nadine et toute son équipe de l'Université de Paris qui nous ont accueillies et qui nous ont fourni le matériel nécessaire à la réalisation des PCR. Merci à l'équipe du LabCeti pour les explications et le prêt de certains appareils.

Je remercie également les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer ce travail : Mme Giltair, Mr Kestemont, Mme Kirschvink et Mr Poumay.

Merci aussi à tous mes cokoteurs de Bomel, Julien, Vinc, Xa, Ju, Adri, Steffy, Math, Andrei et tous les autres sans qui toutes ces années d'étude n'auraient pas été les mêmes. Merci pour ces nombreuses années de vie communautaire, ces soupés familles, ces quizz et tant de souvenirs.

Et surtout merci à Marc sans qui tout cela n'aurait probablement jamais été le même. Merci du soutien, de l'attention et de l'amour dont tu m'as entouré, merci d'être tout simplement toi.

Et enfin, je tiens tout particulièrement à remercier mes parents et ma ribambelle de frères et sœurs, Nicolas, Joan, Jeremy, Morgane, Pierre et Thomas qui, malgré les nombreuses disputes ont toujours cru en moi et ont tous contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail. Je vous souhaite vraiment d'être heureux. J'adresse également un petit remerciement à ma nièce Elyne qui, dans toutes les situations à su me redonner le sourire.

Un grand merci à toutes et à tous.

Evolution temporelle des processus inflammatoires et oxydatifs secondaires à l'ischémie-reperfusion rénale chez le rat

HUBERT Virginie

Résumé

De nos jours, l'insuffisance rénale aiguë (IRA) reste un problème de santé publique majeur corrélé avec des taux de morbidité et de mortalité élevés (Basile *et al.*, 2007). Parmi les origines multiples d'IRA, l'ischémie/reperfusion (I/R) constitue l'une des causes majeures chez l'adulte. Afin de rencontrer les objectifs de cette étude, le travail expérimental a consisté à induire une insuffisance rénale ischémique chez le rat, de manière à caractériser certains aspects de la fonction rénale *in vivo* dans ce contexte physiopathologique particulier. La première partie de cette étude a été consacrée à l'analyse de l'évolution de la fonction rénale post-ischémique chez deux souches de rats, à savoir les rats Wistar Hanovre (WH), souche communément utilisée en expérimentation animale, et les rats Wistar Furth (WF). Le choix de cette seconde souche a été déterminé par sa capacité de résistance au développement d'une insuffisance rénale chronique (IRC) induite selon différents modèles (Erdely *et al.*, 2003, 2004). Il nous a donc semblé intéressant d'évaluer dans quelle mesure cette résistance pouvait également se manifester dans des conditions d'atteintes aiguës. Dans la seconde partie de ce travail, deux processus importants dans le rein post-ischémique ont retenu notre attention, le stress oxydatif et l'inflammation. Parmi les nombreuses molécules impliquées dans ces phénomènes, l'une d'entre elles nous a plus particulièrement intéressés, le monoxyde d'azote (NO).

L'étude de la fonction rénale post-ischémique indique une augmentation de la diurèse associée à une baisse de l'osmolarité urinaire ainsi qu'à une diminution de la capacité excrétoire du sodium et du potassium, les premiers jours après l'I/R. Ces modifications semblent plus prononcées chez les rats WF que chez les rats WH. De plus, l'étude des processus inflammatoires a permis d'observer une infiltration moins importante de macrophages et de lymphocytes T CD8 chez les rats WF que chez les rats WH. L'étude du stress oxydatif, quant à lui, ne démontre aucune différence significative de l'excrétion de malondialdéhyde (MDA), ni du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) entre les deux souches de rats. De même, les variations de l'excrétion urinaire de NO en conditions post-ischémiques semblent être similaires dans les deux souches de rats. Néanmoins, l'étude de l'expression des NO synthases (NOS) à différents délais post-ischémiques indique que la NOS inducible (délétère) est surexprimée chez les WH. A l'inverse, la NOS endothéliale (protectrice) est surexprimée chez les WF. Ces observations semblent indiquer que les différences fonctionnelles ainsi qu'inflammatoires observées entre les rats WH et les rats WF pourraient être mises en relation avec des mécanismes affectant la régulation de la synthèse du NO.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: N. Caron

Co-promoteur : M. Raes

AVANT-PROPOS	1
1. CARACTÉRISTIQUES MORPHO-FONCTIONNELLES DU REIN	2
2. L'INSUFFISANCE RÉNALE	3
2.1. LÉSIONS POST-ISCHEMIQUES.....	4
2.1.1. <i>Altérations du compartiment tubulaire</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Altérations du compartiment vasculaire</i>	<i>5</i>
2.1.3. <i>Altérations fonctionnelles.....</i>	<i>5</i>
2.1.4. <i>Processus de régénération du tissu rénal.....</i>	<i>6</i>
2.1.5. <i>Emergence de nouveaux biomarqueurs.....</i>	<i>7</i>
2.2. PROCESSUS INFLAMMATOIRES POST-ISCHEMIQUES.....	7
2.2.1. <i>Cibles de la réaction inflammatoire</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Cascade des cytokines inflammatoires.....</i>	<i>8</i>
2.2.3. <i>Migration trans-endothéliale des leucocytes.....</i>	<i>9</i>
2.2.4. <i>Acteurs cellulaires de la réaction inflammatoire</i>	<i>9</i>
2.3. LES PROCESSUS OXYDATIFS POST-ISCHEMIQUES.....	11
2.3.1. <i>Origine des ROS.....</i>	<i>11</i>
2.3.2. <i>Lésions relatives aux ROS.....</i>	<i>12</i>
2.4. LE MONOXYDE D'AZOTE (NO).....	13
2.4.1. <i>Biosynthèse du NO</i>	<i>13</i>
2.4.2. <i>Régulation des NO synthases</i>	<i>13</i>
2.4.3. <i>Rôles biologiques du NO.....</i>	<i>14</i>
2.4.4. <i>Paradoxe du NO.....</i>	<i>15</i>
3. OBJECTIFS.....	16

Liste des abréviations

ADH	Hormone antidiurétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
BH4	Tetrahydrobioptérine
C	Cortex
CAM	Cell-adhesion molecules
CD	Cellule dendritique
Cl ⁻	Chlore
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
Cr	Créatinine urinaire
Ctl	Contrôle
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DSR	Débit sanguin rénal
DO	Densité optique
eNOS	NO synthase endothéliale
E _{H2O2}	Excrétion urinaire d'H ₂ O ₂
E _{MDA}	Excrétion urinaire de malonedialdéhyde
E _{NO}	Excrétion urinaire de NO
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FGF	Fibroblaste growth factor
FMN	Flavine mononucleotide
FTG	Feed-back tubuloglomérulaire
GPX	Glutathione peroxydase
h	heure
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Horseradish peroxydase
HSC	Hematopoietic stem cell
HSP	Heat shock proteins
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule-1
IFN γ	Interféron γ
IGF-1	Insulin like growth factor
IM	Inner Medulla
i.p	intrapéritonéale
IR	Insuffisance rénale
I/R	Ischémie/Reperfusion
IRA	Insuffisance rénale aiguë
IRC	Insuffisance rénale chronique
ISOM	Inner stripes of the outer medulla
K ⁺	Potassium
KIM-1	Kidney injury molecule-1
l	litre
MCP-1	Monocyte-chemoattractant protein-1
MDA	Malonedialdéhyde
mEq	milliéquivalent
ml	millilitre

mOsm	milliOsmole
MPO	Myéloperoxydase
MSC	Mesenchymatous stem cells
Na ⁺	Sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NK	Natural killer
NO	Oxyde nitrique
NO _x	Métabolites du NO
NO ₂ ⁻	Nitrite
NO ₃ ⁻	Nitrate
NOS1	NO synthase de type 1
NOS2	NO synthase de type 2
NOS3	NO synthase de type 3
NS	Non significatif
OM	Outer Medulla
OSOM	Outer stripes of the outer medulla
PCR	Polymerase chain reaction
PMN	Polymorpho- nuclear neutrophil
P _u	Poids de l'urine
RM	Repeated measurement
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rotation par minute
RT	Reverse transcription
SD	Sprague Dawley
SEM	Erreur standard de la moyenne
SOD	Superoxyde dismutase
t	Temps de récolte
TBARS	Acide thiobarbiturique
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
U _{Na} V	Natriurèse
UV	Diurèse
WH	Wistar Hanovre
WF	Wistar Furth
8 OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

Avant-propos

Les expériences effectuées au cours de ce travail de fin d'études s'inscrivent dans un projet de recherche développé au sein de notre laboratoire. Il a pour finalité de préciser certains facteurs et processus impliqués dans l'étiologie des altérations morpho-fonctionnelles associées à l'ischémie/reperfusion (I/R) rénale. Ce modèle reproduit la plupart des événements qui caractérisent l'insuffisance rénale aiguë post-ischémique, et correspond plus particulièrement aux conditions de l'allogreffe chez l'homme.

Afin d'atteindre les objectifs déterminés dans ce contexte, le travail expérimental a consisté à induire une insuffisance rénale ischémique chez le rat, de manière à caractériser certains aspects de la fonction rénale *in vivo*.

La première partie de cette étude a ainsi été consacrée à l'analyse de l'évolution de la fonction rénale post-ischémique chez deux souches de rats, à savoir les rats Wistar Hanovre (WH), l'une des souches les plus communément utilisée en expérimentation animale, et les rats Wistar Furth (WF). Le choix de cette seconde souche a été déterminé par sa capacité de résistance au développement d'une insuffisance rénale chronique (IRC) induite selon différents modèles (Erdely *et al.*, 2003, 2004). Il nous a donc semblé intéressant d'évaluer dans quelle mesure cette résistance pouvait également se manifester dans des conditions d'atteintes rénales aiguës.

Dans la seconde partie de ce travail, deux processus importants dans le rein post-ischémique ont plus particulièrement retenu notre attention, à savoir le stress oxydatif et l'inflammation. Parmi les nombreuses molécules impliquées dans ces phénomènes, l'une d'entre elles nous a plus particulièrement intéressés, le monoxyde d'azote (NO). En effet, ce dernier joue un rôle essentiel dans les différents processus étudiés. En outre, les études réalisées par l'équipe d'Erdely tendent à démontrer que la résistance à l'IRC que manifestent les rats WF pourrait être mise en relation avec le maintien d'une production significative de NO, alors que les rats WH présentent une déficience en NO associée à l'IRC que ces animaux développent dans certaines conditions (Erdely *et al.*, 2003, Erdely *et al.*, 2004). Par ailleurs, le NO s'avère également être une molécule hautement réactive capable de former du peroxynitrite, en présence d'un stress oxydatif. Sur la base de ces éléments, l'évaluation de l'implication du NO dans le contexte physiopathologique qui nous intéresse s'avère particulièrement pertinente.

1. Caractéristiques morpho-fonctionnelles du rein

Le rein est l'un des principaux organes effecteurs qui participe à l'homéostasie du milieu intérieur en régulant l'excrétion d'eau, d'électrolytes et de molécules organiques. De plus, le rein assure l'élimination de métabolites endogènes tels que l'urée, la créatinine et l'acide urique. Il joue en outre un rôle osmorégulateur et contribue au maintien de l'équilibre acido-basique. Enfin, le rein sécrète de nombreuses hormones qui participent à la régulation de l'hémodynamique intrarénale (système rénine-angiotensine, endothéline, prostanoïdes, ...), à la production de globules rouges (érythropoïétine) ou au métabolisme calcique (calcitriol) (Rennke *et al.*, 2007).

Du point de vue anatomique, le rein est localisé en position rétropéritonéale dans les fosses lombaires de la cavité abdominale. Il est entouré de trois enveloppes, une enveloppe externe, la capsule fibreuse, une capsule adipeuse et le fascia rénal, plus interne. Le rein comporte deux parties : le cortex en périphérie et la médulla, elle-même subdivisée en médulla externe (OM-Outer Medulla) et en médulla interne (IM-Inner Medulla). Au sein de l'OM, on distingue deux zones : la plus externe ou OSOM (Outer Stripe of the Outer Medulla) et la plus interne ou ISOM (Inner Stripe of the Outer Medulla). Nous utiliserons au cours de ce travail les abréviations anglophones OSOM, ISOM et IM (**Figure 1**).

L'unité fonctionnelle du rein, le néphron, existe sous deux conformations : les néphrons corticaux et juxta-médullaires, identifiés en fonction de la position du corpuscule rénal dans le parenchyme et de la longueur de leur anse de Henlé (**Figure 2**). Le corpuscule rénal est constitué d'un réseau de capillaires glomérulaires entouré par la capsule de Bowman¹. La seconde partie du néphron est composée d'une succession de structures tubulaires :

- Le tubule proximal constitué d'une première partie contournée incluant le segment S1 et S2², suivie d'une partie droite correspondant au segment S3³.

- Les branches descendante et ascendante de l'anse de Henlé. Les néphrons corticaux présentent un glomérule superficiel, leur branche descendante est fine et courte⁴ et se poursuit directement par une branche ascendante large⁶. Au contraire, dans le néphron juxta-médullaire dont le glomérule est situé dans la partie plus interne du cortex, la branche descendante fine⁴ s'enfonce profondément dans la médulla interne et se poursuit par une branche ascendante fine⁵ qui s'élargit ensuite pour former un segment large⁵.

- Le tubule distal dont la partie contournée⁸ communique avec le tube collecteur cortical¹⁰ par l'intermédiaire d'un segment connecteur⁹.

- Enfin, chaque néphron comporte un appareil juxta-glomérulaire impliqué notamment dans les processus de sécrétion de la rénine et dans le rétrocontrôle tubuloglomérulaire. Cette structure est composée de la *macula densa*⁷, un ensemble de cellules appartenant au tubule distal en contact avec le pôle vasculaire du glomérule, des cellules mésangiales extra-glomérulaires possédant des propriétés phagocytaires et contractiles, ainsi que des cellules juxta-glomérulaires (cellules musculaires lisses de l'artériole afférente) appelées cellules granulaires, capables de sécréter de la rénine.

Chacun de ces éléments constitutifs joue un rôle spécifique dans la formation de l'urine. Ainsi, la filtration glomérulaire a lieu au sein du glomérule, permettant la formation de l'ultrafiltrat glomérulaire. Celui-ci transite ensuite tout le long du tubule rénal et subit des processus de réabsorption et de sécrétion répondant aux besoins physiologiques de l'organisme et donnant ainsi naissance à l'urine définitive.

Le réseau vasculaire intrarénal présente un niveau d'organisation complexe (**Figure 3**). La perfusion des reins correspond à environ 25% du débit cardiaque, c'est-à-dire en moyenne 1,25 l/ min pour une masse qui ne représente que moins de 0,5% du poids corporel. De plus, le débit sanguin rénal n'est pas distribué de manière équivalente dans les différentes zones du rein.

Ainsi, la plus grande partie du flux sanguin rénal est distribuée vers le cortex afin de faciliter la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire des électrolytes et de l'eau, tandis que le flux sanguin de la médullaire est réduit et plus lent afin de préserver le gradient osmotique cortico-papillaire nécessaire à la concentration urinaire (Harrois et Duranteau, 2007). L'artère rénale se subdivise successivement en artères interlobaires, arquées¹³, interlobulaires¹⁰, puis en artéριοles afférentes⁶. Ces artéριοles se ramifient en réseaux capillaires artéριο-artériels constituant le glomérule et se regroupent ensuite en artéριοles efférentes⁵. Cette dernière se divise à son tour en capillaires péri-tubulaires qui vont former un nouveau réseau post-glomérulaire¹¹ autour de tous les tubules corticaux (proximaux et distaux). Ils sont ensuite relayés par la circulation veineuse⁹⁻¹⁴. Dans le cas particulier des néphrons juxta-médullaires, certaines branches de l'artéριοle efférente se distribuent dans la médullaire et y forment les vasa recta¹⁵. Ces structures de type capillaires, décrits comme descendants ou ascendants, jouent un rôle primordial dans le processus complexe de concentration des urines.

Outre son niveau d'organisation complexe, la circulation rénale possède également une capacité élevée d'auto-régulation permettant de maintenir à des valeurs assez stables le débit sanguin rénal (DSR) et le débit de filtration glomérulaire (DFG) et ce, en dépit de variations de la pression artérielle dans certaines limites physiologiques (Navar *et al.*, 1996). De nombreux autres facteurs d'origines hormonale, nerveuse ou endothéliale sont également impliqués dans la régulation de l'hémodynamique rénale et dans le maintien de l'homéostasie hydro-électrolytique.

2. L'insuffisance rénale

De nos jours, l'insuffisance rénale (IR) reste un problème de santé publique majeur, associé à une morbidité et une mortalité élevées dans le monde entier. En effet, dans les unités de soins intensifs, 25 à 30% des patients développent cette pathologie, contre 3 à 7% dans les autres unités cliniques. Parmi l'ensemble de la population souffrant d'IR, 5 à 6% nécessitent une thérapie de remplacement telle que la dialyse ou la greffe rénale (Brenner, 2008). L'ensemble de ces chiffres illustre donc bien la nécessité de mieux comprendre la multitude des phénomènes impliqués.

Généralement, on distingue deux formes d'insuffisance rénale :

- L'insuffisance rénale aiguë (IRA), caractérisée par une interruption brutale et potentiellement réversible de la fonction rénale ;
- L'insuffisance rénale chronique (IRC), se développant silencieusement pendant des mois, voire des années, et caractérisée par une destruction progressive et irréversible de la fonction rénale, conduisant finalement au déclin de la fonction rénale globale (Chatterjee, 2007).

L'IR se définit comme une incapacité du rein à accomplir de manière appropriée la filtration du plasma, illustrée par un déclin du débit de filtration glomérulaire (DFG). A cela s'ajoutent des altérations des fonctions tubulaires et hémodynamiques. D'un point de vue clinique, l'IR se caractérise par une polyurie associée à un déclin de l'osmolarité urinaire, une créatininémie élevée ainsi qu'une rétention d'électrolytes et d'eau dans le sang et les fluides extracellulaires.

Sur le plan causal, on distingue trois causes principales d'IRA (**Figure 4**):

- Pré-rénale : ce type d'IRA résulte d'une hypoperfusion rénale pouvant avoir diverses origines telles qu'une diminution du volume circulant pouvant survenir en cas de troubles gastro-intestinaux, d'insuffisance cardiaque ou de choc septique (Thadani *et al.*, 1996).
- Post-rénale : elle survient suite à une obstruction des voies excrétrices telles que des pathologies prostatiques ou des tumeurs rétropéritonéales ou pelviennes (Thadani *et al.*, 1996).

- Intrinsèque : l'IRA résulte d'une altération primaire intra-rénale (Chatterjee, 2007) dont les origines sont multiples. Ces altérations peuvent affecter les tubules, l'interstitium, les vaisseaux ou les glomérules. Au niveau des tubules, les lésions sont le plus souvent d'origines ischémiques ou néphrotoxiques (Thadani *et al.*, 1996).

Au cours de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'IRA post-ischémique telle qu'on l'observe par exemple lors d'une allogreffe rénale. Pour étudier les mécanismes physiologiques impliqués dans cette pathologie, nous avons utilisé un modèle expérimental d'ischémie/reperfusion (I/R), associé à une néphrectomie controlatérale (Declèves *et al.*, 2006).

2.1. Lésions post-ischémiques

L'ischémie, suivie de la reperfusion se définissant comme le rétablissement du flux sanguin, est responsable de lésions caractéristiques du tissu rénal. En effet, dans un premier temps, l'ischémie entraîne une interruption du flux sanguin et donc de l'apport en oxygène nécessaire au fonctionnement optimal des tissus et organes. La reperfusion est donc essentielle pour prévenir la mort cellulaire, mais peut contribuer de manière significative aux lésions tissulaires. Ces lésions de reperfusion peuvent être dues à l'afflux brutal d'éléments figurés du sang (et en particulier de neutrophiles) dans la microcirculation, entraînant ainsi une obstruction et donc un obstacle à l'écoulement sanguin. Il est aussi possible que ces lésions soient dues à un dysfonctionnement endothélial associé au développement d'un stress oxydatif (Soullier *et al.*, 2005).

2.1.1. Altérations du compartiment tubulaire

La réponse tissulaire à l'hypoxie varie fortement selon la structure tubulaire concernée. En outre, l'hétérogénéité de distribution du flux sanguin rénal est en partie responsable de la sévérité des lésions post-ischémiques observées (Thadani *et al.*, 1996). En effet, dans la médullaire externe, la lenteur du flux sanguin la place dans un état relativement hypoxique par rapport aux autres régions du rein. Par conséquent, dans l'OSOM, toute diminution de la perfusion réduit l'apport en oxygène et entraîne ainsi le développement de lésions tissulaires importantes (Weinberg, 1991). Ces lésions sont d'autant plus conséquentes que la demande métabolique est plus élevée dans cette zone (Harrois et Duranteau, 2007), principalement au niveau des segments S3 des tubules proximaux ainsi que dans la branche ascendante de l'anse de Henlé. Or, en phase ischémique, le métabolisme devient anaérobie et le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est ralenti voire inhibé, entraînant ainsi un déficit énergétique ne permettant plus aux mitochondries d'assurer la synthèse d'ATP par la voie de la phosphorylation oxydative (Eschwege, 2005). Cette déplétion en ATP conduit à une perturbation du cytosquelette d'actine apical et à une perte des jonctions « tight » et « adherens ». Ce phénomène est à l'origine de la perte de la polarité cellulaire et de la bordure en brosse des cellules des tubules proximaux. De plus, la localisation des intégrines est affectée, provoquant ainsi le détachement de certaines cellules dans la lumière tubulaire (Devarajan, 2006). Ces événements vont entraîner la formation de « casts » qui obstruent la lumière tubulaire et augmentent la pression intra-tubulaire (Thadani *et al.*, 1996). De plus, l'activité des pompes Na^+/K^+ -ATPase est compromise, ce qui provoque une accumulation intracellulaire de Na^+ et d'eau et conduit à un accroissement du volume cellulaire ce qui peut, le cas échéant, accentuer l'obstruction tubulaire (Paller, 1994). Il en résulte

un transfert liquidien depuis l'espace tubulaire vers le milieu interstitiel, favorisant ainsi la formation d'un œdème tissulaire (Vetterlein *et al.*, 1986) ainsi que la diminution du DFG.

Du point de vue biochimique, la déplétion en ATP conduit à une augmentation de la séquestration calcique dans le réticulum endoplasmique ainsi qu'à une diminution de l'extrusion du calcium cytosolique dans l'espace extracellulaire (Devarajan, 2006), dues à la perturbation fonctionnelle des pompes Ca^{++} -ATPases (Rana *et al.*, 2001). En conséquence, une fraction de ce calcium résiduel sera pris en charge par les mitochondries, entraînant une surcharge calcique mitochondriale qui va favoriser le découplage de la phosphorylation oxydative. Ce processus aura pour conséquence d'altérer la synthèse de l'ATP et d'augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), telles que le peroxyde d'hydrogène (Padanilam, 2003).

2.1.2. Altérations du compartiment vasculaire

Suite à un épisode d'I/R, le DSR est réduit de 40 à 50% (Jerkic *et al.*, 2004). A ce déficit de perfusion s'ajoutent des dysfonctionnements de la régulation hémodynamique intrarénale (Conger et Weil, 1995).

➤ Altérations structurelles

La congestion et la vasoconstriction post-ischémiques vont prolonger l'hypoxie tissulaire, conduisant à une aggravation des lésions, à la mort cellulaire (Devarajan, 2005) ainsi qu'à des dommages structurels et biochimiques au niveau des cellules endothéliales. De manière générale, ces lésions sont similaires à celles observées dans les cellules tubulaires. Cependant, certains aspects plus spécifiques aux cellules endothéliales sont à considérer :

- L'altération des jonctions « tight » augmente la perméabilité endothéliale et réduit son rôle de barrière physique, favorisant ainsi la formation d'œdème. Celui-ci va comprimer les capillaires peritubulaires et entretenir la congestion post-ischémique (Basile, 2007).
- L'activation des leucocytes par divers facteurs incluant les cytokines, les chimiokines, les eicosanoïdes et les ROS va engendrer une surexpression des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales (Basile, 2007). Cette activation conduit à un gonflement cellulaire, à une perte de la barrière endothéliale (Bonventre et Weinberg, 2003) ainsi qu'au développement d'interactions entre l'endothélium et les leucocytes ou plaquettes, favorisant la formation de microthrombi (Basile, 2007). De plus, cette surexpression de molécules d'adhésion favorise la diapédèse au niveau des sites inflammatoires.

La **Figure 5**, ci-contre, reprend les différentes altérations structurelles visibles après I/R.

2.1.3. Altérations fonctionnelles

L'une des principales altérations fonctionnelles survenant lors d'une IRA est la diminution du DFG. Cette diminution du DFG peut être attribuée aux processus suivants :

- l'activation du rétrocontrôle tubuloglomérulaire, consécutive à l'accumulation du Na^+ au niveau de la macula densa. En effet, la perte de la polarité cellulaire, la redistribution membranaire des pompes Na^+ - K^+ -ATPase et les altérations des jonctions serrées vont provoquer l'augmentation de la concentration des ions Na^+ dans le tubule distal (Bonventre et Weinberg, 2003)
- un déséquilibre de la balance des facteurs vasoactifs en faveur d'une vasoconstriction (Brenner, 2008).

- un dysfonctionnement endothélial (Brenner, 2008).
- l'obstruction tubulaire résultant de la formation de « casts » (Brenner, 2008).

La **Figure 6**, ci-contre, récapitule les différentes altérations fonctionnelles visibles après I/R.

2.1.4. Processus de régénération du tissu rénal

En conditions physiologiques, le turnover des cellules tubulaires rénales est très faible (Bonventre, 2003). Néanmoins, ces cellules présentent une capacité remarquable de régénération et de prolifération, notamment après un épisode d'I/R. Dans de nombreuses conditions pathologiques, ces processus de réparation tissulaire sont observés et impliquent des cytokines comme le TGF- β (transforming growth factor) capable d'influencer la croissance, la migration et la différenciation cellulaires (Bonventre, 2003 ; Bonventre et Weinberg, 2003 ; Devarajan, 2005). Il est toutefois à noter que, dans certains cas, une rémission incomplète de la fonction rénale peut survenir lors d'une IRA et évoluer progressivement vers une IRC (Basile *et al.*, 2001), caractérisée par le développement d'une fibrose (Conger et Weil, 1995).

Du point de vue morphologique, les processus de réparation sont annoncés par l'apparition de cellules épithéliales dédifférenciées exprimant la vimentine, marqueur de la pluripotence des cellules mésenchymateuses (Devarajan, 2005 ; 2006). Au cours des phases suivantes, les cellules surexpriment des gènes codant pour divers facteurs de croissance tels que l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), l'hépatocyte growth factor (HGF) et le fibroblast growth factor (FGF). En phase finale du processus, leur différenciation en un épithélium normal et polarisé s'accompagne de l'expression de NCAM (neural cell adhesion molecule) et de l'ostéopontine, et inclut une succession d'événements similaires à ceux observés au cours de l'organogénèse (Devarajan, 2005).

Bien qu'aujourd'hui il semble évident que les cellules tubulaires rénales soient capables de recoloniser et de reconstruire les différents segments tubulaires, leur origine reste controversée (Brenner, 2008 ; Little et Bertram, 2009 ; Goligorsky *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, trois schémas hypothétiques peuvent être pris en considération (**Figure 7**):

- Dédifférenciation des cellules tubulaires rénales : elles pourraient provenir de cellules tubulaires rénales viables, qui transiteraient vers un phénotype indifférencié, pour ensuite proliférer et restaurer l'architecture et la fonction tubulaire.
- Intervention des cellules souches résidentielles : certains auteurs postulent l'existence de cellules souches endogènes capables de régénérer les tubules. Bien que l'existence de ces cellules ait été démontrée dans de nombreux tissus dont la peau et la prostate, aucune étude n'a encore pu démontrer de façon formelle la présence de ces cellules dans le rein.
- Intervention de cellules souches extrarénale : les cellules souches possèdent la capacité de se différencier en un nombre limité de types cellulaires. Les cellules mésenchymateuses (MSC) et hématopoïétiques (HSC), localisées dans la moelle osseuse, peuvent se différencier en adipocytes, chondrocytes ou en ostéocytes dans le cas des MSC ou en cellules sanguines dans le cas des HSC (Brenner, 2008). Plusieurs études semblent indiquer que tant les HSC (Brenner, 2008) que les MSC (Devarajan, 2006) pourraient être mobilisées dans le rein via la circulation sanguine, s'y établir, se différencier et participer à la régénération tubulaire (Vanstherthem *et al.*, 2008).

La régénération fait probablement appel à une combinaison de ces divers mécanismes.

2.1.5. **Emergence de nouveaux biomarqueurs**

De nos jours, l'IRA constitue un problème de santé publique majeur qui, une fois établi, ne dispose d'aucun traitement efficace, le clinicien ne pouvant apporter qu'une méthode de substitution, la dialyse (Devarajan, 2008). Toute détection et intervention précoces peuvent améliorer de manière significative son pronostic. Il est donc urgent d'identifier de nouveaux biomarqueurs précoces de l'IRA, mais également de l'IRC. Bien que nous disposions actuellement de certains biomarqueurs tels que la créatinine, beaucoup sont imprécis et ne se manifestent que tardivement (Devarajan, 2008). Dans le cas de la créatinine, couramment utilisée, il s'avère que sa concentration plasmatique varie fortement avec l'âge, le sexe, la masse musculaire et l'état d'hydratation. En outre, au cours de changements rapides et importants du DFG, la créatininémie ne variera que lorsque la fonction rénale aura atteint un nouvel état d'équilibre, ce qui peut parfois nécessiter un délai de 2 à 3 jours (Devarajan, 2008).

Le développement de la transcriptomique et de la protéomique ont largement contribué à l'identification de nouveaux biomarqueurs précoces (Devarajan, 2008). En effet, comme mentionné auparavant, les cellules de l'épithélium tubulaire proximal sont la cible d'une série d'événements après I/R. Au cours des phases précoces post-ischémiques, l'expression de 7 gènes se trouvent fortement augmentée (Mishra *et al.*, 2003); c'est le cas notamment des gènes codant pour KIM-1 (Kidney injury molecule-1) (Ichimura *et al.*, 2004) et NGAL (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin) (Devarajan, 2008).

➤ **NGAL**

Le NGAL est une protéine de 25kDa (Siew *et al.*, 2009) appartenant à la famille des lipocalines et composée de 8 feuillets β antiparallèles formant un calice au fond duquel des ligands hydrophobes peuvent se nicher (Soni *et al.*, 2009). Des études de clonages moléculaires ont révélé l'existence d'un gène similaire au NGAL humain chez la souris.

En conditions physiologiques, une expression faible du NGAL a été démontrée dans certains tissus tels que les poumons, l'estomac, la trachée, le colon et les reins (Soni *et al.*, 2009). Son expression est induite lors de stimulation de l'épithélium (Mishra *et al.*, 2003). Au niveau rénal, une origine tubulaire proximale était couramment attribuée à ces protéines. Cependant, des études ultérieures ont montré que les anses de Henlé et les tubules collecteurs constituent les sites principaux de synthèse de NGAL (Soni *et al.*, 2009). Du point de vue fonctionnel, le NGAL favorise la croissance et la différenciation des cellules tubulaires (Siew *et al.*, 2009), participant ainsi au processus de régénération post-ischémique (Soni *et al.*, 2009). Certaines données suggèrent également un rôle pro-apoptotique de NGAL, tout au moins dans certains types cellulaires (Mishra *et al.*, 2003).

Sur un modèle de souris soumis à une I/R bilatérale de 30 minutes, le NGAL se retrouve dans les urines dès 2 heures après I/R. Il est également détecté chez des souris soumises à des périodes d'ischémie plus courtes, à savoir 5, 10 et 20 minutes, le NGAL apparaissant après 4 heures (10 et 20 minutes) ou 6 heures (5 minutes) (Soni *et al.*, 2009).

En médecine humaine, il pourrait constituer un outil prédictif du développement de l'IRA après une transplantation rénale et fait ainsi l'objet de nombreuses investigations (Devarajan, 2008).

2.2. **Processus inflammatoires post-ischémiques**

Chez les vertébrés, le système immunitaire est divisé en deux parties : l'immunité innée et l'immunité adaptative. Dans l'immunité adaptative, les lymphocytes T et B utilisent des récepteurs spécifiques des antigènes du non-soi, générés par réarrangement génique et

hypermutation. Quant à l'immunité innée, elle est ubiquiste et constitue la première ligne de défense de l'organisme, assurée par les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les neutrophiles. A l'intersection de ces deux voies se rencontrent les TLR (Toll-like receptor), capables d'activer l'immunité adaptative et de reconnaître des motifs moléculaires spécifiques, bien qu'appartenant à l'immunité innée (Kawai et Akira, 2006).

2.2.1. Cibles de la réaction inflammatoire

L'immunité innée peut être induite par quatre types de stimuli (**Figure 8**):

1) **Les lésions** survenant suite à l'hypoxie peuvent entraîner la libération ou l'exposition de facteurs cellulaires tels que les heat shock proteins (HSP) et les TLR. Ceux-ci sont des récepteurs capables de déclencher la réponse inflammatoire, suite à la reconnaissance de motifs particuliers comme des pathogènes ou des ligands endogènes tels que des HSP. En réponse à la fixation du ligand, ces récepteurs stimulent l'immunité innée via l'activation de NFκB et la production de chimiokines pro-inflammatoires. Il s'avère que l'expression de certains TLR par les cellules tubulaires est augmentée en cas d'I/R (Thurman, 2007).

2) D'autres **facteurs pro-inflammatoires** peuvent être synthétisés activement par les cellules rénales en réponse à l'hypoxie ou à la reperfusion, c'est le cas, par exemple, de IL-1, produit suite à l'activation de NFκB. Cependant, il est difficile de distinguer les signaux inflammatoires générés par les cellules rénales en réponse à l'hypoxie des facteurs produits par l'initiation et le maintien de la réaction inflammatoire (Thurman, 2007).

3) L'activation du système immunitaire peut également survenir suite à des **altérations structurelles** des protéines ou de la surface cellulaire. Ce type de reconnaissance fait à nouveau appel aux TLR mais elle peut aussi être activée par la perte des protéines de surface telles que les CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité). De plus, l'I/R altère la surface des cellules épithéliales tubulaires, favorisant de cette manière l'activation du complément et donc la production de cytokines pro-inflammatoires (Thurman, 2007).

4) Enfin, l'activation du système immunitaire peut aussi survenir suite à une **diminution de l'expression de signaux anti-inflammatoires**, c'est le cas par exemple des inhibiteurs du complément dont l'expression chute fortement après l'I/R (Thurman, 2007).

De manière générale, les cellules tubulaires épithéliales peuvent donc être considérées comme des acteurs effectifs participant à l'initiation et au maintien de la réaction inflammatoire (Thurman, 2007).

2.2.2. Cascade des cytokines inflammatoires

Suite à l'I/R, deux procédés vont conduire à la production de chimiokines par les cellules tubulaires :

1) L'activation de la voie du complément (Steffens *et al.*, 2009), qui participe à la production de chimiokines telles que le TNFα et l'IL-6 (Thurman, 2007).

2) La stimulation des TLR, qui active NFκB (Kawai et Akira, 2006) favorisant l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1β, l'IL-6 et le TNFα (Kawai et Akira, 2005).

L'IL-6, le TNF α et l'IL1 β vont tous trois contribuer à la propagation des processus inflammatoires notamment via certains processus de rétrocontrôle positif et favoriser l'expression de molécules d'adhésion permettant l'infiltration des neutrophiles (Patel *et al.*, 2005). En outre, ces cytokines pro-inflammatoires, associées au stress oxydatif, activent une cascade de réactions qui aboutissent à la production de MCP-1, une chimiokine sécrétée à la fois par les PMNs (leucocytes polymorphonucléaires) ainsi que par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules mésangiales et les cellules tubulaires (Viedt *et al.*, 2002). MCP-1 est une chimiokine sélective des monocytes qui stimule leur migration dans l'intima de la paroi artérielle et dans le tissu (Gerdprasert *et al.*, 2002 ; Sung *et al.*, 2002). La sécrétion de MCP-1 active les cellules épithéliales tubulaires, ce qui conduit à une sécrétion d'IL-6 et d'ICAM-1 (Inter-cellular adhesion molecule-1) (Viedt *et al.*, 2002). (**Figure 9**).

2.2.3. Migration trans-endothéliale des leucocytes

Lorsque l'adhésion des leucocytes à l'endothélium a été initiée, notamment grâce à l'expression induite de sélectines et d'intégrines (Ley et Reutershan, 2006), la migration des leucocytes vers le tissu cible s'effectue en plusieurs étapes (**Figure 10**):

- **Le rolling** : au cours de cette première étape, les sélectines exprimées sur l'endothélium se lient aux hydrates de carbone, ce qui a pour effet de ralentir les cellules circulantes qui semblent alors « rouler » le long de l'endothélium.

- **Le déclenchement ou triggering** : à ce stade du processus, les chimiokines sécrétées à la fois par les cellules endothéliales ainsi que par les cellules épithéliales tubulaires viennent se fixer aux hydrates de carbone des protéoglycans de l'endothélium. Elles sont alors prêtes à interagir via leur deuxième site de fixation avec les leucocytes ralentis par les sélectines (Roitt et Brostoff, 2001). Cette stimulation va déclencher une augmentation de la régulation des intégrines leucocytaires et déterminer le type de cellules qui sera amené à traverser l'endothélium vasculaire (Dunon *et al.*, 1996).

- **L'adhésion** : la régulation des intégrines ainsi que leur activation (passage d'une faible affinité à une forte affinité) va enclencher la mise en place d'une interaction consolidée entre les leucocytes et l'endothélium (Dunon *et al.*, 1996). L'interaction des intégrines avec leurs récepteurs CAMs est particulièrement importante dans les phénomènes inflammatoires, leur expression étant augmentée par certaines cytokines inflammatoires (Ulbrich *et al.*, 2003 ; Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 2001). Dans le cas de l'IRA, ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule), sont les principaux récepteurs des intégrines qui participent aux phénomènes d'adhésion.

- **La migration** : au cours de cette étape a lieu la migration du leucocyte entre deux cellules endothéliales. L'extension de pseudopodes originaires du leucocyte lui permet de s'insérer dans les jonctions endothéliales et de les élargir par un mécanisme de levier (Luscinskas *et al.*, 2002).

2.2.4. Acteurs cellulaires de la réaction inflammatoire

Les PMNs sont les premières cellules recrutées sur le site de l'inflammation. Après avoir migré dans les tissus et exercé leurs fonctions de phagocytose et de dégranulation, ils deviennent rapidement apoptotiques et sont éliminés par les macrophages tissulaires provenant des monocytes sanguins. Lorsque l'inflammation perdure, les cellules résidentes expriment des quantités croissantes de chimiokines, attirant ainsi les monocytes et les lymphocytes dont les

capacités de synthèse de cytokines sont nettement supérieures à celles des PMNs (Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 2001). Chaque type cellulaire joue donc un rôle précis dans le développement de la réaction inflammatoire, tant d'un point de vue chronologique que fonctionnel.

- **Les PMNs** : le PMN est avant tout l'une des principales cellules de l'immunité innée, capables de phagocyter ou de tuer les micro-organismes avant même que se soit établie une réponse anticorps et/ou lymphocytaire. Il constitue le type leucocytaire le plus abondant chez l'être humain et s'accumule dans les heures qui suivent le développement de la réaction inflammatoire aiguë. Dans l'IRA, des PMN ont été détectés aussi bien dans le compartiment interstitiel que dans la lumière tubulaire. De plus, les PMN interstitiels s'avèrent fonctionnellement différents des PMN vasculaires de par leur contenu réduit en TNF α , IL-4, IL-6, IL-10 et IFN γ . Ceci laisse à penser que le processus de transmigration conduit à une libération de cytokines, qui favorisent elles-mêmes le passage trans-endothélial (Awad *et al.*, 2009).

- **Les monocytes/macrophages** : l'infiltration des PMNs est suivie de celle des monocytes, caractérisés par une durée de vie importante et jouant un rôle critique dans l'organisation de la réaction inflammatoire (Kaneider *et al.*, 2006). Un gradient de MCP-1 soluble est requis pour permettre le passage trans-endothélial des monocytes (Weber, 2003), qui migrent ensuite vers le tissu rénal où ils se transforment en macrophages, capables de produire une large gamme de molécules actives pouvant être à la fois bénéfiques ou délétères. En effet, la régulation des macrophages par intervention thérapeutique semble être une voie prometteuse dans le contrôle de l'évolution de l'inflammation chronique (Kaneider *et al.*, 2006). D'autre part, les macrophages semblent également être impliqués dans les processus de régénération du tissu rénal (Friedewald et Rabb, 2004).

- **Les cellules dendritiques (CD)** : les CD constituent un lien essentiel entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, de par leur capacité de sécrétion de molécules pro-inflammatoires, elles vont pouvoir interagir avec les cellules NK (Natural killer), les activer et stimuler l'ensemble des processus inflammatoires. Les CD sont également spécialisées dans l'activation des cellules T. Des études ont d'ailleurs montré qu'après I/R, les CD se déplacent vers les nœuds lymphatiques où elles induisent une prolifération des cellules T spécifiques de l'antigène (Kinsey *et al.*, 2008).

- **Les lymphocytes** : les lymphocytes T CD4, et plus particulièrement l'IFN γ produit par ces cellules, semblent jouer un rôle important au cours des phases précoces d'IRA, les souris CD4^{-/-} présentant une résistance au développement de l'IRA (Burne-Taney *et al.*, 2003 ; Kinsey *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a également été montré dans un modèle de néphropathie toxique, qu'une déplétion en CD4 engendrait des dommages histologiques et fonctionnels, suggérant dans ce cas un rôle protecteur (Wang *et al.*, 2001). Un autre type de lymphocytes est aussi impliqué dans l'IRA, le lymphocyte T CD8, qui possède des fonctions cytotoxiques et suppressives (Wang *et al.*, 2001). Enfin, bien que le rôle des lymphocytes B dans l'IRA reste mal compris, il semble que ces cellules participent au développement des lésions associées à l'I/R, étant donné qu'une déficience en lymphocytes B confère une résistance au développement des lésions (Friedewald et Rabb, 2004).

La **Figure 11** ci-contre reprend divers processus inflammatoires participant au développement des lésions post-ischémiques.

2.3. Les processus oxydatifs post-ischémiques

2.3.1. Origine des ROS

En conditions physiologiques, des radicaux libres sont produits par notre organisme et s'avèrent essentiels à son bon fonctionnement. Ces molécules produites en faible quantité ont un rôle de médiateurs tissulaires, de défense ou de résidus énergétiques. Leur production est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense tels que les antioxydants capables de s'adapter en fonction des radicaux présents. Cependant, en situations pathologiques, il peut survenir un déséquilibre de cette balance antioxydants/prooxydants conduisant à une surproduction de radicaux, couramment appelé stress oxydatif. Ce phénomène s'observe après I/R et contribue au développement des lésions (Favier, 2003).

Les radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules ou ions dérivés de l'oxygène et munis d'un électron libre les rendant hautement réactifs. Il en existe cinq types principaux : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et le radical NO également appelé monoxyde d'azote (Harrois et Duranteau, 2007). Parmi ces ROS formées, toutes ne présentent pas la même réactivité, l' $O_2^{\cdot -}$ et le NO étant par exemple faiblement réactifs. Néanmoins, ils constituent des précurseurs d'autres espèces telles que l' OH^{\cdot} et le radical peroxyde (ROO^{\cdot}), deux molécules hautement réactives (Favier, 2003).

En conditions physiologiques et physiopathologiques, l' $O_2^{\cdot -}$ est produit par des voies enzymatiques et non-enzymatiques :

Les sources enzymatiques incluent la NADPH oxydase, localisée sur la membrane cellulaire des PMNs, des macrophages et des cellules endothéliales, et ainsi que le cytochrome P450. Comme mentionné précédemment, un infiltrat inflammatoire s'installe dans le tissu post-ischémique. Les cellules phagocytaires sont alors le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative, consistant en l'activation de la NADPH oxydase (Favier, 2003). De plus, les PMN disposent d'une enzyme, la MPO (myéloperoxydase), qui peut catalyser, en présence de Cl^- , la transformation de l' H_2O_2 en acide hypochlorique ($OHCl$), une molécule capitale dans la lutte anti-infectieuse mais néanmoins très réactive (**Figure 12**) (Bonventre, 1993). Quant au cytochrome P450, il semble capable de libérer son groupement hémique. Cette forme d'hème n'est pas associée à une apoprotéine et peut donc agir comme prooxydant potentiel conduisant à la formation de ROS (Akagi *et al.*, 2002). Par ailleurs, après I/R, survient une conversion protéolytique de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase, cette dernière utilisant comme donneur d'électrons l'oxygène (**Figure 12**). La xanthine oxydase constitue une source enzymatique de production d' H_2O_2 (Paller, 1994).

La production non enzymatique d' $O_2^{\cdot -}$ a lieu lorsqu'un électron solitaire est directement transféré à l'oxygène par des coenzymes réduits tels que la flavine qui n'est autre que la coenzyme du complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale. Or, la chaîne de transport mitochondriale constitue à elle seule une source très importante d' $O_2^{\cdot -}$, notamment après I/R (Turrens, 2003).

Diverses réactions vont ensuite permettre de produire une large gamme de ROS. La réaction d'Haber-Weiss, divisée en deux étapes, va permettre de produire de l' OH^{\cdot} , particulièrement réactif à partir d' H_2O_2 et d' $O_2^{\cdot -}$. La présence d'un métal de transition tel que le cuivre ou le fer est également requise au bon fonctionnement de cette réaction. Pour pouvoir participer à la réaction, ce dernier doit être libre ou lié à un complexe de très faible poids moléculaire ; on comprend ainsi le rôle prooxydant occupé par l'hème provenant du cytochrome P450 (Paller, 1994) (**Figure 12**).

Face à ces diverses ROS, et plus particulièrement face à l' OH^\cdot , l'organisme a mis en place divers mécanismes de défense. La superoxyde dismutase (SOD) va, par exemple, assurer la transformation d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 , une forme de ROS plus stable mais hautement diffusible. Celle-ci est ensuite détoxifiée en H_2O grâce à l'intervention de la catalase ou de la glutathion peroxydase (GPX) (**Figure 12**). L'I/R semble affecter ces mécanismes de défense de type enzymatique (Harrois et Duranteau, 2007), comme l'indique une diminution de l'activité enzymatique, de l'expression protéique ainsi que du taux d'ARN de la catalase, de la SOD et de la GPX (Dobashi *et al.*, 2000) (**Figure 13**).

2.3.2. Lésions relatives aux ROS

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides. Des lésions secondaires sont également observées et sont dues au caractère mutagène des métabolites libérés, notamment lors de l'oxydation lipidique. Les lipides, et plus particulièrement leurs acides gras polyinsaturés, sont la cible principale du radical hydroxyle. Celui-ci est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Ce dernier se transforme en peroxyde au contact d'un acide gras qui devient alors un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent, quant à eux, subir deux types d'évolution : être réduits ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter. Cette réaction en chaîne porte le nom de peroxydation lipidique (**Figure 14**) (Favier, 2003). La peroxydation lipidique est un facteur crucial dans la propagation des dommages cellulaires associés à l'I/R, conduisant à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique ainsi que des membranes mitochondriales et lysosomales (Noiri *et al.*, 2001). De plus, la peroxydation lipidique produit un grand nombre de métabolites secondaires, essentiellement des aldéhydes capables d'accentuer les dommages oxydatifs.

Parmi ces produits secondaires, le malonedialdéhyde (MDA), provenant de la peroxydation lipidique, est le plus étudié (Del Rio *et al.*, 2005). Cependant, les mécanismes impliqués dans sa formation restent mal compris. Selon une première hypothèse, un précurseur du MDA pourrait être formé à partir de molécules endoperoxydes « prostaglandine like » provenant de l'endoperoxyde converti en méthyle linoléate. La deuxième hypothèse est basée sur la formation d'hydroperoxyde suivi d'un clivage β de la chaîne d'acides gras générant un hydroperoxyaldehyde. Le MDA peut aussi être produit par divers processus enzymatiques au départ de prostaglandines. Le danger potentiel que représente cette molécule provient de sa capacité d'interagir avec les bases de l'ADN et de former des liaisons, non seulement entre ces bases, mais également entre les bases et les protéines des histones (Del Rio *et al.*, 2005).

L'ADN est une molécule très sensible aux attaques par les ROS. Parmi l'ensemble des bases puriques et pyrimidiques qui compose l'ADN, la guanine est la plus sensible à l'oxydation. Au cours d'une attaque oxydative, un groupement hydroxyle peut être ajouté en position 8 de la guanine formant ainsi le 8-OHdG (8-hydroxydéoxyguanosine). Ceci est l'une des altérations principales de l'ADN induites par les radicaux libres (Wu *et al.*, 2004). L'ensemble de ces mutations vont altérer davantage la chaîne respiratoire conduisant à une production excessive de ROS et de radicaux libres, eux-mêmes capables de générer des mutations conduisant à la mise en place d'un cercle vicieux (Kakimoto *et al.*, 2002). De plus, ces dommages de l'ADN vont entraîner une activation excessive des enzymes de réparation, telles que PARP, qui vont alors consommer de l'ATP afin de réparer les lésions et donc aggraver la déplétion énergétique (Padanilam, 2003).

Suite aux attaques radicalaires, les protéines vont subir des réticulations par formation de liaisons, de coupures ou de modifications de certains acides aminés. Ces protéines modifiées par l'oxydation perdent leur fonction biologique et deviennent plus sensibles aux protéases. Elles deviennent également très hydrophobes et forment des amas anormaux, associés aux lipides. Les

protéines les plus sensibles aux radicaux libres sont principalement celles qui comportent un groupement sulfhydryle. C'est le cas d'un grand nombre de protéines de transport et d'enzymes qui vont alors être inactivées (Favier, 2003).

La **Figure 15** récapitule les mécanismes de production des ROS ainsi que les lésions consécutives à ces derniers (D'Autreaux et Toledano, 2007).

2.4. Le monoxyde d'azote (NO)

2.4.1. Biosynthèse du NO

Le NO est un radical libéré à partir d'un acide aminé, la L-arginine, en présence d'oxygène (Eschwege, 2005). Sa biosynthèse complexe fait appel à certains cofacteurs tels que la tétrahydrobioptérine (BH₄), le FAD (Flavine adénine dinucléotide), le FMN (Flavine mononucléotide) et le fer. Cette réaction est catalysée par les NO synthases (NOS) qui transforment ainsi la L-arginine en NO et en citrulline, après passage par un état intermédiaire, l'hydroxyarginine (Nathan, 1992).

Il existe trois types d'isoformes de NOS : la NOS neuronale (nNOS ou NOS1), la NOS inductible (iNOS ou NOS2) et la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3), nNOS et eNOS étant des isoformes constitutives. L'expression de ces trois isoformes se rencontre dans le rein.

- **nNOS** : l'expression de la nNOS a été observée dans différents types de cellules neuronales. Dans le rein, la médulla interne semble constituer la zone où se retrouve la concentration la plus élevée en nNOS (Martin *et al.*, 2002), répartie entre le tubule collecteur et les branches descendantes de l'anse de Henlé (Terada *et al.*, 1992). On la retrouve également dans les tubules collecteurs de l'OSOM et du cortex (Terada *et al.*, 1992) ainsi que dans les tubules proximaux, mais en quantité moindre (Wang *et al.*, 1998). Dans le cortex, plusieurs études rapportent également une expression élevée de nNOS dans la macula densa où le NO peut jouer un rôle régulateur dans le rétrocontrôle tubuloglomérulaire (FTG) (Mount et Power, 2006 ; Singh et Thomson, 2010).

- **iNOS** : de manière générale, l'expression de la iNOS est induite par les lipopolysaccharides bactériens et par les cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages ainsi que dans toutes les cellules de l'organisme. Cette induction pourrait être transmise par NFκB. Cependant, l'expression de la iNOS est assez controversée, certains auteurs ayant été incapables de la détecter chez des animaux sains (Kosaka *et al.*, 2003). A l'opposé, d'autres auteurs ont identifié deux formes de la iNOS, l'une rencontrée dans les macrophages et l'autre dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire (Mohaupt *et al.*, 1994). A l'opposé des formes constitutives, la iNOS produit des quantités beaucoup plus importantes de NO et de façon continue.

- **eNOS** : la eNOS est fortement exprimée dans les cellules de l'endothélium vasculaire rénal, dans les artères, les artérioles, les capillaires glomérulaires et les vasa-recta, et contribue à la régulation de l'hémodynamique intrarénale (Bachmann *et al.*, 1995 ; Mount et power, 2006).

2.4.2. Régulation des NO synthases

Il existe une différence majeure dans la régulation des NOS inductible et constitutives, l'activité de ces dernières dépendant d'un cofacteur supplémentaire, la calmoduline, contrôlée par la concentration en ions calciques. En présence d'une concentration élevée en calcium, la calmoduline se lie au calcium et active les NOS. Au contraire, l'activité de la iNOS est insensible aux variations de la concentration du calcium cytosolique (Nathan, 1992). Par ailleurs, l'activité des NOS est régulée par la biodisponibilité du substrat limitant, la L-arginine (Baylis, 2008). La L-arginine est un acide aminé semi-essentiel, ce qui signifie qu'en conditions

physiologiques, sa production s'avère généralement suffisante alors qu'en conditions de stress, un apport alimentaire supplémentaire est requis (Barbul, 1986 ; Beaumier *et al.*, 1996). La L-arginine est synthétisée à partir de citrulline au cours d'une réaction en deux étapes impliquant l'arginosuccinate synthase et l'arginosuccinate lyase.

2.4.3. Rôles biologiques du NO

Dans le rein, le NO possède un nombre important de fonctions physiologiques:

- **Régulation hémodynamique:** le NO est un vasodilatateur puissant sécrété de façon continue par les cellules endothéliales vasculaires, permettant ainsi de garantir une résistance vasculaire rénale peu élevée. En outre, le NO participe à l'autorégulation du DSR de par ses effets sur le rétrocontrôle tubuloglomérulaire « FTG » (Mount et Power, 2006), ce qui permet de minimiser les variations du DFG et de maintenir aussi constante que possible la quantité de fluide et d'électrolytes délivrés au niveau de la macula densa (Thomson *et al.*, 1999). La nNOS, étant donné sa distribution intrarénale, pourrait jouer un rôle dans la régulation du FTG, en diminuant la vasoconstriction de l'artériole afférente induite par le FTG (Szabo *et al.*, 2003). Ainsi, chez des animaux traités par un inhibiteur des NOS, s'observe une diminution de DFG survenant probablement suite à une augmentation de la résistance de l'artériole afférente secondaire à un déficit de la production de NO (Kopkan et Majid, 2009).

- **Régulation de la pression artérielle :** l'un des principaux rôles homéostasiques du rein consiste à assurer le maintien de la pression sanguine et du bilan sodique, qui contrôle le volume de liquide extracellulaire. Par exemple, en cas d'augmentation de la pression sanguine, le rein accroît la natriurèse, ce qui permet à terme de restaurer une pression sanguine normale grâce à des processus synergiques complexes. La synthèse de NO semble contribuer à cette réponse même si les mécanismes impliqués ne sont pas complètement élucidés (Mount et Power, 2006).

- **Régulation tubulaire des transports sodiques :** l'effet du NO sur la réabsorption tubulaire du sodium varie d'une région à l'autre du rein. Cependant, dans la majorité des cas, le NO inhibe le transport du sodium, ce qui lui confère des effets natriurétiques et diurétiques. Dans les tubules proximaux, le NO exerce un effet inhibiteur direct sur la réabsorption du sodium (Ortiz *et al.*, 2004), par diminution de l'activité de l'échangeur Na^+/H^+ ainsi que de celle de la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ (Mount et Power, 2006). Le NO inhibe également la réabsorption du sodium dans la branche large ascendante de l'anse de Henlé qui, en conditions physiologiques, réabsorbe 25 à 30 % de la charge filtrée du sodium. L'effet inhibiteur du NO dans ce segment tubulaire s'exerce sur le co-transporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (Marin et Sessa, 2007).

- **Inflammation :** le rôle du NO et des dérivés nitrés dans l'évolution de l'inflammation n'est pas clair. Bien qu'en conditions physiologiques, les phagocytes humains ne produisent que très peu de NO (Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 2001), les lésions induites par l'I/R vont engendrer l'activation de la iNOS et entraîner une production accrue de NO (Thurman, 2007). Cependant, la fonction du NO produit reste controversée, certains lui attribuant des propriétés anti-inflammatoires (Halbwachs-Mecarelli *et al.*, 2001) notamment via l'inhibition de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Grisham *et al.*, 1999), alors que d'autres le considèrent comme un médiateur des lésions tubulaires. Cet aspect paradoxal du NO sera abordé plus en détail dans le paragraphe suivant.

2.4.4. Paradoxe du NO

Outre ses nombreux effets bénéfiques, le NO est capable d'interagir avec l' $O_2^{\cdot -}$ et de générer du peroxynitrite (ONOO $^{\cdot -}$) (Chatterjee, 2007), un métabolite cytotoxique pouvant causer des dommages à l'ADN et une peroxydation lipidique. De plus, en conditions acides, ce composé est capable de former le radical hydroxyle, hautement réactif. Il contribue également au stress oxydatif en inactivant certaines enzymes anti-oxydantes telles que la SOD (Chatterjee, 2007).

Une diminution de l'abondance et de l'activité de la nNOS a lieu après une réduction de la masse rénale (Tain *et al.*, 2006). De façon similaire, la eNOS est inhibée lors de dysfonctionnements endothéliaux tels que ceux rencontrés dans le cadre de l'IRA (Goligorsky *et al.*, 2002). A l'opposé des formes constitutives, la iNOS va être induite après I/R suite à la production de cytokines et de ROS. Le NO produit par celle-ci va favoriser la production de peroxynitrite. Les inhibiteurs de la iNOS améliorent la fonction rénale et diminuent la formation apparente de peroxynitrite après I/R (Walker *et al.*, 2000). Il semble dès lors que l'origine du NO ainsi que les mécanismes qui régulent sa production puissent jouer un rôle déterminant dans les fonctions exercées par ce médiateur polyvalent.

3. Objectifs

Les objectifs de ce mémoire étaient d'évaluer l'évolution temporelle de la fonction rénale post-ischémique d'une part, ainsi que celle des processus inflammatoires et oxydatifs d'autre part. L'implication du NO a également été étudiée en réalisant les expériences sur une deuxième souche de rats, les WF, résistants au développement d'une IRC. Il nous a donc semblé intéressant d'évaluer dans quelle mesure cette résistance pouvait également se manifester dans des conditions d'atteintes rénales aiguës.

Les objectifs expérimentaux ont été structurés comme suit :

- *Evaluation de la **fonction rénale** dans un groupe « contrôle » ainsi que sur une période de 14 jours après I/R.* La collecte d'échantillons urinaires chez des rats placés en cage métabolique a permis de mesurer diverse variables caractérisant la capacité excrétoire du rein. La fonction rénale a également été évaluée par la mesure de la créatininémie, un indicateur de la filtration glomérulaire. L'utilisation d'un nouveau biomarqueur de l'insuffisance rénale aiguë, le NGAL, a finalement permis de compléter cette première partie.
- *Evaluation de la séquence d'événements **des processus inflammatoires** dans le tissu rénal « contrôle », ou post-ischémique.* Les tissus récoltés nous ont permis d'une part de quantifier le taux de MCP-1 tissulaire en association avec l'évolution du nombre de monocytes/macrophages et, d'autre part, d'effectuer un comptage du nombre de lymphocyte T CD-8.
- *Evaluation temporelle des **événements oxydatifs** en conditions contrôles ainsi qu'à différentes périodes après I/R.* Pour ce faire, des dosages de malonédialdéhyde et de peroxyde d'hydrogène ont été réalisés sur des échantillons urinaires prélevés en cage métabolique.
- *Evaluation du **métabolisme du NO** par dosage de l'excrétion urinaire de ses métabolites, ainsi que par l'évaluation de l'expression des NO synthases 2 et 3 sur des échantillons tissulaires.* Ces analyses ont pour objectif de déterminer dans quelle mesure les deux souches de rats, Wistar Hanovre et Wistar Furth, peuvent se différencier en terme de production de NO et d'expression des NOS dans des conditions d'insuffisance rénale aiguë.

1.	MODÈLE D'ISCHÉMIE/REPERFUSION RÉNALE.....	17
2.	PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX.....	17
2.1.	PROTOCOLE A : SUIVI TEMPOREL DES ANIMAUX PLACÉS EN CAGE MÉTABOLIQUE	17
2.2.	PROTOCOLE B : PRÉLÈVEMENTS DU SANG ET DU TISSU RÉNAL	18
3.	RÉCOLTE DES ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES	18
3.1.	PRÉLÈVEMENT DES URINES	18
3.2.	PRÉLÈVEMENT DU PLASMA	18
3.3.	PRÉLÈVEMENT DES TISSUS.....	18
4.	MESURE DE LA DIURÈSE	18
5.	OSMOLARITÉ.....	19
6.	EXCRÉTION URINAIRE DU Na^+ ET DU K^+	19
7.	CRÉATININÉMIE.....	19
8.	DOSAGE DE LA CRÉATININE URINAIRE.....	19
9.	DOSAGE URINAIRE DU NGAL	20
10.	DOSAGE DU H_2O_2 URINAIRE	20
11.	DOSAGE DU MALONEDIALDÉHYDE URINAIRE.....	21
12.	DOSAGE DES MÉTABOLITES DU NO.....	21
13.	DOSAGE DU MCP-1 TISSULAIRE	22
14.	ETUDE HISTOLOGIQUE DU TISSU RÉNAL.....	22
14.1.	PRÉ-TRAITEMENTS.....	22
14.1.1.	<i>Enrobage</i>	<i>22</i>
14.1.2.	<i>Déparaffinage et réhydratation</i>	<i>23</i>
14.2.	COLORATION À L'HÉMALUN ET AU BLEU DE LUXOL	23
14.3.	IMMUNOHISTOCHEMIE	23
14.3.1.	<i>Démasquage des sites antigéniques :</i>	<i>23</i>
14.3.2.	<i>Prétraitements</i>	<i>23</i>
14.3.3.	<i>Anticorps primaires</i>	<i>24</i>
14.3.4.	<i>Anticorps secondaires</i>	<i>24</i>
14.3.5.	<i>Système d'amplification.....</i>	<i>24</i>
14.3.6.	<i>Révélation.....</i>	<i>24</i>
15.	COMPTAGES CELLULAIRES	24
16.	PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL (TECHNOLOGIE TAQMAN).....	24
16.1.	EXTRACTION DE L'ARN TOTAL	25
16.2.	TRANSCRIPTION INVERSE (RT : REVERSE TRANSCRIPTION)	25
16.3.	AMPLIFICATION PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)	25
17.	STATISTIQUES	26

Les animaux utilisés dans le cadre de ce travail sont des rats Wistar-Hanovre (WH) et Wistar-Furth (WF), provenant d'un élevage interne de l'animalerie Extension Médecine des FUNDP. Ces animaux séjournent dans une animalerie éclairée 12 heures par jour et où la température est maintenue à 21°C et l'humidité relative à 50%. Chaque animal reçoit quotidiennement de l'eau fraîche *ad libitum* et 25g de nourriture sèche (Harlan, Pays-Bas), contenant 16% de protéines.

1. Modèle d'ischémie/reperfusion rénale

Les manipulations ont été réalisées chez des rats âgés de 8 semaines environ et d'un poids moyen de 220 à 260g. Le modèle expérimental utilisé est celui de l'ischémie/reperfusion (I/R), associée à une néphrectomie controlatérale (Declèves *et al*, 2006). Pour rappel, ce modèle comporte trois types d'interventions, effectuées sous anesthésie générale (Nembutal : pentobarbital de sodium, 60 mg/kg i.p, Ceva Santé animale, Bruxelles, Belgique) (**Figure 16**) :

- *procédure CONTROLE* (Ctl) : après induction de l'anesthésie, les reins sont prélevés et une ponction aortique est effectuée afin de récolter un échantillon de sang. L'animal est euthanasié par injection intrapéritonéale (i.p.) d'une dose létale de Nembutal (200 mg/kg).

- *procédure SHAM* : seule une néphrectomie du rein droit est effectuée chez l'animal anesthésié. Après suture distincte des plans musculaire et cutané, l'animal peut récupérer de la procédure chirurgicale.

- *procédure IR* : après une laparotomie pratiquée chez l'animal anesthésié, une néphrectomie du rein droit est effectuée. Le flux sanguin de l'artère rénale gauche est ensuite interrompu durant 60 minutes grâce à un clamp microvasculaire (Fine Science Tools, Heidelberg, Germany). Dès le début de l'ischémie, la surface du rein présente un aspect pâle très différent de sa couleur naturelle rouge foncé. Au terme de cette ischémie, la reperfusion du rein est contrôlée par un examen macroscopique de sa surface. Après suture distincte des plans musculaire et cutané, l'animal peut récupérer de la procédure chirurgicale.

Les animaux des groupes SHAM et I/R sont à nouveau anesthésiés à des délais précis post-I/R, soit 12h, 24h, 48h, 7 jours ou 14 jours après l'intervention, afin de prélever des échantillons biologiques (rein et sang) avant de procéder à l'euthanasie.

2. Protocoles expérimentaux

Dans le cadre de ce mémoire, deux protocoles expérimentaux ont été mis en œuvre :

2.1. Protocole A : Suivi temporel des animaux placés en cage métabolique

Ce protocole a pour objectif d'étudier, sur un animal conscient, l'évolution temporelle de plusieurs variables caractérisant la fonction rénale.

Les animaux (I/R, SHAM et contrôles) placés en cage métabolique sont acclimatés à ce type d'hébergement durant 4 jours, avant d'intégrer le protocole expérimental A. La cage métabolique permet la séparation des matières fécales et des urines (**Figure 17**) et permet également de mesurer quotidiennement les quantités de nourriture et d'eau ingérées, ainsi que le volume urinaire excrété. Les prélèvements d'échantillons urinaires en conditions « contrôles » sont effectués sur deux périodes consécutives de 24h précédant la procédure opératoire. Les échantillons sont ensuite récoltés quotidiennement pendant 14 jours, au terme desquels l'animal est euthanasié afin de récolter les échantillons biologiques (**Figure 18**). Ces cages, entreposées à l'animalerie, sont soumises aux mêmes conditions d'éclairage, d'humidité et de température que celles décrites auparavant.

Les quantités de nourriture, d'eau et d'urine pesées à intervalles de 24h fournissent des informations relatives aux comportements dipsiques, alimentaire et urinaire de l'animal. Toutefois, certaines précautions sont nécessaires afin d'éviter des erreurs expérimentales :

- les cages métaboliques sont nettoyées tous les 2 jours ;
- la nourriture mise à disposition est finement broyée afin que les rats ne la dispersent pas, ce qui pourrait contaminer l'échantillon urinaire. En outre, il est ainsi possible de connaître avec précision la quantité de nourriture ingérée, paramètre qui nous sera utile dans la suite de notre étude ;
- une fine couche d'huile est déposée dans le collecteur d'urines afin d'éviter une évaporation de celles-ci pendant chaque période de récolte de 24h.

2.2. Protocole B : Prélèvements du sang et du tissu rénal

Afin de compléter les échantillons biologiques prélevés dans le cadre du protocole A, d'autres rats (WH et WF) ont également été soumis à la procédure d'I/R et ensuite sacrifiés après une période de 24h, de 48h ou de 7 jours post-I/R afin de prélever le rein gauche et le sang en vue d'analyses ultérieures. Des animaux « contrôles » et « SHAM » appartenant aux deux souches ont également été inclus dans ce protocole.

3. Récolte des échantillons biologiques

3.1. Prélèvement des urines

Les urines sont récoltées selon les méthodes décrites ci-dessus, chez des animaux placés en cage métabolique pour une durée de 14 jours. Les urines récoltées sont centrifugées à 1600g pendant 15 minutes à 4°C afin d'éliminer tout résidu alimentaire ou pileux, le surnageant est ensuite récolté et stocké à -80 °C jusqu'à utilisation.

3.2. Prélèvement du plasma

Avant de procéder à l'euthanasie des animaux, un échantillon sanguin est prélevé par ponction aortique, sous anesthésie générale. Le sang hépariné est ensuite centrifugé à 1600 g pendant 15 min à 4°C et le plasma récolté est stocké à -80°C.

3.3. Prélèvement des tissus

Après euthanasie de l'animal, le rein gauche est prélevé et pesé. Ensuite, le rein est coupé suivant le plan sagittal, afin de fixer par immersion une moitié de l'organe dans le Bouin alcool (liquide de Duboscq-Brazil) (Declèves *et al*, 2006), en vue d'analyses histologiques ultérieures détaillées ci-après. L'autre moitié est micro-disséquée en 4 zones distinctes (C : Cortex, OSOM : Outer stripe of the outer medulla, ISOM : Inner stripe of the outer medulla, IM: Médulla interne), qui sont alors fixées dans l'azote liquide et stockée -80°C en vue d'utilisations futures.

4. Mesure de la diurèse

La diurèse (UV - ml/24h) correspond au volume des urines émises par unité de temps. En pratique, le volume des urines est corrélé au poids de celles-ci.

$$UV = P_u / t$$

P_u = poids de l'urine (g)

t = temps de récolte (24h)

5. Osmolarité

L'osmolarité des échantillons urinaires est déterminée à l'aide d'un micro-osmomètre (Fiske Model 210, Norwood, MA, USA). Le principe de cet appareil est basé sur la détermination du point cryoscopique défini comme le point d'équilibre entre la phase solide et la phase liquide. En pratique, l'échantillon de 20 µl est rapidement refroidi et sa cristallisation est induite par une impulsion mécanique. La solution est ensuite progressivement réchauffée jusqu'à atteindre son point cryoscopique où coexistent les phases solide et liquide. Ce dernier est alors mesuré avec une précision de 0.002°C et converti par l'appareil en unités d'osmolarité (mOsm/l).

6. Excrétion urinaire du Na⁺ et du K⁺

Les concentrations en Na⁺ et en K⁺ sont déterminées dans les différents échantillons urinaires par spectrophotométrie de flamme (IL 943, Instrumentation Laboratory, Italie). La photométrie d'émission répond au principe suivant : l'échantillon de 25 µl est vaporisé dans une flamme propane-air excitant les atomes de Na⁺ ou de K⁺. Les électrons de l'orbitale périphérique de l'atome sont projetés à un état énergétique supérieur. Cet état énergétique est instable de telle sorte que les atomes retournent à l'état fondamental en émettant des photons dont la longueur d'onde est caractéristique de l'atome. L'énergie produite sous forme de photons est proportionnelle aux nombres d'atomes contenus dans l'échantillon vaporisé et donc à la concentration, exprimée en mEq/l.

Ensuite, l'excrétion urinaire du Na⁺ (natriurèse, U_{Na}V - mEq/24h) et du K⁺ (kaliurèse, U_KV - mEq/24h) est calculée comme suit :

$$U_{Na}V = [Na^+] \times UV \times 10^{-3}$$

$$U_KV = [K^+] \times UV \times 10^{-3}$$

[Na⁺] ou [K⁺] = concentrations urinaires en Na⁺ ou K⁺ déterminées à l'aide du spectrophotomètre à flamme (mEq/l).

7. Créatininémie

La concentration de créatinine plasmatique est mesurée à l'aide d'une méthode colorimétrique basée sur la réaction de Jaffé. Au cours de cette réaction, 100 µl de plasma ou de standard (100 µmol/l) sont mélangés à 1 ml d'une solution de picrate alcalin (soude : 16 g/l, phosphate de sodium 19 g/l et acide picrique 2 g/l). Ces derniers forment un complexe photométrable à une vitesse directement proportionnelle à la concentration en créatinine. La densité optique du complexe formé est donc lue à deux temps bien précis, à savoir 20 et 80 secondes après le mélange des solutions, à une longueur d'onde de 490 nm.

Le calcul s'effectue comme suit :

$$((DO_{\text{éch 80sec}} - DO_{\text{éch 20sec}}) / (DO_{\text{std 80sec}} - DO_{\text{std 20sec}})) * [std]$$

8. Dosage de la créatinine urinaire

Etant donné que certains composants présents dans les urines sont susceptibles d'interférer avec la réaction de Jaffé, nous avons utilisé un kit commercial de détection (Creatinine Detection Kit, Assay Designs, Ann Arbor, USA) spécifique du dosage urinaire. Dans ce dernier, le réactif de détection intervenant dans la réaction de Jaffé a été modifié.

Protocole

1. Charger les puits d'une plaque 96 puits avec 50 µl d'échantillon ou de standard
2. Ajouter 100 µl de réactif de détection de la créatinine
3. Incuber 30 minutes à température ambiante
4. Mesurer l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (Multiskan Ex, Thermo electron corporation, Bruxelles)

Les concentrations urinaires en créatinine sont ensuite déterminées sur base de solutions standards, allant de 0 à 20 mg de créatinine/dl.

9. Dosage urinaire du NGAL

Le NGAL ou « neutrophil gelatinase-associated lipocalin » est une protéine qui subit une régulation spectaculaire et précoce dans les cellules des tubules proximaux après une atteinte rénale. Le dosage de ce nouveau biomarqueur est réalisé à l'aide d'un kit ELISA commercial (Rat NGAL ELISA Kit, Bioporto Diagnostics, Danemark) dont le principe est basé sur un dosage enzymatique de type « sandwich ».

Protocole

1. Diluer les échantillons 10000X (Ctl) ou 50000X (I/R)
2. Charger les puits pré-coatés avec 100 µl d'échantillon ou de standard. La plaque est fournie pré-coatée avec un anticorps de capture monoclonal anti-NGAL
3. Incuber 1 heure à température ambiante
4. Eliminer les éléments non fixés par lavage
5. Ajouter 100 µl d'anticorps biotylés (Biotinylated Rat NGAL Antibody) qui viennent alors se lier aux protéines NGAL fixées au préalable sur la plaque
6. Incuber 1 heure à température ambiante
7. Eliminer les anticorps non fixés par lavage
8. Ajouter 100 µl de Streptavidine-HRP. Cette dernière possède une affinité accrue pour la biotine
9. Incuber 1 heure à température ambiante
10. Eliminer la Streptavidine-HRP non fixée par lavage
11. Ajouter 100 µl de substrat TMB. Une réaction colorimétrique se met alors en place entre l'HRP et le TMB
12. Incuber exactement 10 minutes à température ambiante dans le noir
13. Stopper la réaction par l'ajout de 100 µl d'une solution « stop »
14. Mesurer l'absorbance à 450 nm

10. Dosage du H₂O₂ urinaire

Le dosage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est réalisé sur échantillons urinaires à l'aide d'un kit commercial (Amplex Red Hydrogen Peroxide/peroxidase assay kit, invitrogen) basé sur la réaction suivante : en présence de peroxydase, « l'Amplex Red » réagit avec l'H₂O₂ en produisant un produit d'oxydation rouge fluorescent, le résorufin.

Protocole

1. Préparer des échantillons « standards » du H₂O₂, dont la concentration s'échelonne de 0 à 40 µM
2. Charger les puits avec 50 µl d'échantillons ou de standard
3. Préparer la solution de travail

- a. 50 µl d'une solution à 10mM d'amplex red
- b. 100 µl d'une solution d'horseradish peroxydase (10 U/ml)
- c. 4.85 ml de buffer
4. Ajouter 50 µl de la solution de travail dans chaque puits
5. Incuber 30 minutes à température ambiante
6. Mesurer l'absorbance à 560 nm à l'aide d'un lecteur de plaques

L'excrétion urinaire d'H₂O₂ est ensuite calculée grâce à la formule suivante :

$$E_{H_2O_2} = [H_2O_2]/[créatinine] \times 100$$

[H₂O₂] = Concentration en H₂O₂ (µM)

[créatinine] = Concentration en créatinine (mg/dl)

11. Dosage du malonedialdéhyde urinaire

La concentration urinaire en malonedialdéhyde (MDA) est déterminée par la mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). 500 µl d'échantillon urinaire ou de standard sont mélangés à 500 µl d'acide thiobarbiturique (1%, pH 1.5) et chauffés au bain-marie durant 30 minutes à 95°C. Après refroidissement sur glace, 1 ml de butanol est ajouté au mélange et l'ensemble est vortexé. Les échantillons sont ensuite centrifugés 10 minutes à 2500 rpm. Pour terminer, 200 µl de la phase supérieure alcoolique (contenant les TBARS) sont chargés sur la plaque et la mesure de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 540 nm. Le calcul de la concentration en MDA est réalisé grâce à la courbe standard (Cayman Chemical Company, USA) dont la concentration s'étend de 0 à 50 µM.

L'excrétion urinaire du MDA est ensuite calculée grâce à la formule suivante :

$$E_{MDA} = [MDA]/[créatinine] \times 100$$

[MDA] = Concentration en MDA (µM)

[créatinine] = Concentration en créatinine (mg/dl)

12. Dosage des métabolites du NO

Le NO est un gaz au temps de demi-vie très court ($t_{1/2} = 4$ secondes), capable de diffuser au travers des membranes lipidiques. Son caractère instable rend son dosage difficile, c'est pourquoi certains dosages indirects, faisant appel à des métabolites plus stables du NO (NOx), tels que le nitrite (NO₂⁻) et le nitrate (NO₃⁻), sont réalisés. L'une des approches permettant de mesurer les concentrations urinaire ou plasmatique en NO consiste à déterminer les concentrations des NOx par la méthode de Griess (**Figure 19**). Pour réaliser ce dosage, nous avons utilisé un kit ELISA (Cayman Chemical Company, USA) dont le fonctionnement est basé sur un dosage enzymatique de type « sandwich ». Le principe de ce dosage consiste à convertir les NO₃⁻ en NO₂⁻ grâce à l'action d'une nitrate réductase. Ces derniers sont ensuite dosés par une réaction colorimétrique, la réaction de Griess, qui se fait en deux étapes. La première consiste en une acidification du NO, responsable de la production d'agents nitrosatifs qui réagissent ensuite avec l'acide sulfanilique (Réactif de Griess 1) pour produire des ions diazonium. Au cours de la seconde étape, ces ions sont couplés à du N-(1-naphthyl) éthylenediamine (Réactif de Griess 2) et forment des dérivés azo-chromophoriques capables d'absorber la lumière entre 540 et 570 nm.

Protocole :

1. Diluer les échantillons (urinaires 10X, plasmatiques 2X)
2. Charger les puits avec 80 µl d'échantillons ou de standards

3. Ajouter 10 µl de « Enzyme Cofactor Mixture » et 10 µl de « Nitrate Réductase Mixture ».
Cette étape permet la conversion du nitrate en nitrite
4. Incuber 1 heure à température ambiante
5. Ajouter successivement 50 µl réactif de Griess 1 et 50 µl de réactif de Griess 2
6. Incuber 10 minutes à température ambiante
7. Mesurer l'absorbance à 550 nm

Les concentrations urinaires en NO sont déterminées sur base de solutions standards contenant de 5 à 35 µM de nitrates. L'excrétion urinaire des métabolites du NO (NO_x) (E_{NO} - µmole/24h), représentant la charge excrétée des métabolites du NO, est ensuite calculée grâce à la formule suivante :

$$E_{NO} = [NO_x] \times UV$$

[NO_x] = Concentration en métabolites du NO (µM)

UV = Diurèse (ml)

13. Dosage du MCP-1 tissulaire

Les échantillons tissulaires (Cortex, OSOM et ISOM) sont homogénéisés dans un tampon phosphate (50 mM, pH=6) à l'aide d'un homogénéisateur tissulaire, à une concentration de 50 mg/ml. Après homogénéisation, les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. La concentration tissulaire en MCP-1 est dosée à l'aide d'un kit ELISA commercial (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA USA) dont le principe est basé sur un dosage enzymatique de type « sandwich ». La concentration du MCP-1 tissulaire est exprimée en pg/mg de tissu.

Protocole :

1. Charger les puits pré-coatés avec 100 µl d'échantillon ou de standard. La plaque est coatée la veille avec l'anticorps de capture anti-MCP-1 et incubée overnight à 4°C
2. Incuber 2 heures à température ambiante
3. Eliminer les éléments non fixés par lavage
4. Ajouter 100 µl de la solution de travail, composée d'un anticorps couplé à une peroxydase
5. Incuber 1 heure à température ambiante
6. Eliminer les anticorps non fixés par lavage
7. Ajouter 100 µl du substrat de la peroxydase
8. Incuber 30 minutes dans l'obscurité
9. Stopper la réaction par l'ajout de 50 µl de solution « stop »
10. Mesurer l'absorbance à 450 nm

14. Etude histologique du tissu rénal

14.1. Pré-traitements

14.1.1. Enrobage

Après prélèvement et section sagittale du rein, chaque moitié est fixée pendant 48h dans du Bouin alcool (eau distillée 22%, formol 26%, acide acétique 7% et une solution d'acide picrique 45% : 6,75 g dans 450 ml d'éthanol absolu). Après fixation, les tissus sont déshydratés dans 3 bains d'éthanol, suivis de 3 bains de butanol au cours d'une période de 48h. Au terme de la déshydratation, les échantillons sont immergés durant 3 jours dans 3 bains successifs de paraffine liquide à 58-60°C. Ils sont ensuite enrobés dans des blocs de paraffine fraîche.

Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un microtome Autocut 2040 (Richert Inc., USA). Les coupes histologiques sont ensuite étalées sur un film d'eau à la surface d'une lame porte-objet préalablement traitée au silane (3-aminopropyltriethoxy-silane, 98%, Sigma, USA) afin d'assurer une meilleure adhésion du tissu sur le verre. Ces lames sont ensuite séchées durant 24h sur une plaque chauffante à 35°C.

14.1.2. Déparaffinage et réhydratation

Les lames sont tout d'abord trempées dans 2 bains de toluène (2 x 5 min) et rincées dans 3 bains d'éthanol absolu. Elles sont ensuite réhydratées 10 minutes dans de l'eau courante.

14.2. Coloration à l'hémalum et au bleu de luxol

Après 5 minutes de rinçage à l'eau courante, les coupes sont colorées 1 minute à l'hémalum de Mayer. Après 5 minutes de rinçage à l'eau courante, les lames sont trempées quelques secondes dans l'éthanol 95% avant d'être traitées pendant 1 minute par le Bleu de Luxol (0,1% dans l'alcool 95°).

Enfin, le montage entre lame et lamelle prépare les coupes à l'observation microscopique. Au cours de cette étape, les lames sont déshydratées dans 3 bains d'éthanol 95%, puis rincées dans un bain de butanol suivi de deux bains de toluène, avant d'être montées au baume synthétique (Thermo Shandon, USA).

14.3. Immunohistochimie

14.3.1. Démasquage des sites antigéniques :

Le but du démasquage est de permettre aux protéines dénaturées au cours de la fixation de présenter des épitopes accessibles aux anticorps. Pour cela, les lames sont plongées dans du tampon citrate et chauffées au four à micro-ondes durant 3 minutes (800W). Elles subissent un second passage de 10 minutes au four à micro-ondes (décongélation) avant d'être refroidies progressivement à température ambiante et enfin rincées à l'eau distillée.

14.3.2. Prétraitements

14.3.2.1. H₂O₂

Le but de cette étape est de permettre l'élimination des peroxydases endogènes qui pourraient réagir avec le DAB (3' Diaminobenzidine, Sigma, USA) utilisé lors de la révélation.

Lors de cette étape les lames sont trempées 5 minutes dans une solution saturée en H₂O₂. Elles sont ensuite rincées dans un bain d'eau distillée et placées dans du tampon PBS.

14.3.2.2. Avidine et biotine

Cette étape a pour but d'éliminer les biotines endogènes afin d'éviter d'éventuelles interactions avec les réactifs contenant de la streptavidine.

Sur chaque coupe, on dépose 50 µl d'une solution d'avidine (1mg /ml). Après 5 minutes, les lames sont rincées au PBS. La même opération est ensuite répétée avec une solution de biotine (1mg/ml).

14.3.2.3. Caséine

Certains constituants tissulaires (collagènes, fibres réticuliniques, fibrinogènes,...) présentent une affinité non-spécifique pour les immunoglobulines constituant de cette manière un potentiel bruit de fond lors de l'immunohistochimie. Afin de saturer ces sites de fixation aspécifiques, 50 µl d'une solution de caséine 0.5% sont déposés sur chaque lame avant une incubation de 15 minutes.

14.3.3. Anticorps primaires

Chaque coupe a été incubée avec 50 µl d'anticorps primaires dilués, pendant 1 heure ou overnight, à température ambiante, puis rincée dans du PBS. L'incubation a été réalisée en chambre humide afin d'éviter toute déshydratation du tissu. Les anticorps utilisés sont repris dans la **Figure 20**.

14.3.4. Anticorps secondaires

L'anticorps secondaire utilisé dans le cadre de ce travail a été :
-l'anticorps polyclonal (chèvre) anti-IgG de souris couplé à la biotine (Dako, Danemark).

Chaque coupe a été incubée avec 50 µl d'anticorps secondaires dilués 50x dans du PBS, en chambre humide. Après 30 minutes, les lames sont rincées dans du PBS.

14.3.5. Système d'amplification

Au cours de cette étape, les lames sont incubées avec 50 µl du complexe ABC peroxydase (Avidine-Biotine-peroxydase Complex, Dako, Danemark) durant 30 minutes en chambre humide. Elles sont ensuite rincées dans 3 bains successifs de PBS.

14.3.6. Révélation

La présence de peroxydases tissulaires est détectée à l'aide d'une solution de DAB 0.05% (3,3' Diaminobenzidine, Sigma, USA), diluée dans 10 ml de PBS contenant 200 µl de H₂O₂. La réaction des peroxydases avec le H₂O₂ permet l'oxydation du DAB qui précipite alors sous forme d'un composé brunâtre visible au microscope. Lorsqu'un contraste optimal est atteint, les lames sont immergées dans l'eau distillée afin de mettre fin à la réaction. Le temps de révélation varie de 2 à 15 minutes.

Ces différentes étapes s'achèvent par la coloration des coupes à l'hémalum-bleu de luxol suivie d'une déshydratation à l'éthanol et du montage des lames au baume synthétique.

15. Comptages cellulaires

Le nombre de macrophages et de lymphocytes est évalué par une technique semi-quantitative (Wattiez *et al.*, 1996). Pour chaque coupe histologique marquée par l'anticorps anti-ED1 (macrophages) ou anti-CD8 (lymphocytes), trois zones du rein (C, OSOM, ISOM) ont été étudiées. Dans chacune de celles-ci, dix champs ont été sélectionnés au hasard. Les observations ont été réalisées, à un grossissement 400X, au moyen d'un microscope optique équipé d'un réticule couvrant une surface de 0.2 mm² par champ. Les cellules marquées ont été dénombrées et classées en fonction de leur localisation. Trois catégories de macrophages ont été définies : les macrophages interstitiels, glomérulaires et tubulaires. L'évaluation de l'infiltration des lymphocytes CD8 a été réalisée en suivant la même technique.

16. PCR quantitative en temps réel (technologie Taqman)

Cette technique a été réalisée à l'aide du système ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et consiste à suivre en temps réel l'amplification d'une séquence d'ADN à l'aide d'une sonde fluorescente complémentaire de l'ADN d'intérêt. La sonde Taqman choisie possède un marqueur fluorescent à son extrémité 5' (FAM, 6-carboxyfluoresceine) et un « quencher » en 3' (TAMRA, 6-carboxytétraméthylrhodamine). Le « quencher » est un chromophore non fluorescent qui dissipe l'énergie qu'il reçoit du fluorophore en libérant de la chaleur lorsqu'il se situe à proximité de celui-ci. Lors de la progression de la polymérase, la

sonde est décrochée et clivée, le fluorophore ne recevant plus l'influence du quencher, la fluorescence peut alors être émise (557nm) (**Figure 21**).

16.1. Extraction de l'ARN total

Les étapes suivantes sont réalisées dans les conditions requises pour préserver au mieux la qualité de l'ARN. L'ARN total a été extrait, en suivant un protocole d'extraction de l'ARN au Trizol. Les extraits tissulaires sont homogénéisés dans du Trizol, à raison de 1 ml pour 25-50 mg de tissu. Après une courte incubation (5 minutes) à température ambiante, 200 µl de chloroforme par ml de Trizol sont ajoutés à l'homogénat, l'ensemble est ensuite mélangé durant 15 secondes et incubé 2 à 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 12000g durant 15 minutes à 4°C, le mélange est séparé en une phase inférieure rouge, la phase phénol-chloroforme, une interphase et une phase supérieure aqueuse peu colorée. Les ARN se trouvent exclusivement dans la phase aqueuse dont le volume correspond à environ 60% du volume du Trizol utilisé pour l'homogénéisation. Après transfert de la phase aqueuse dans un nouvel eppendorf, 500 µl d'isopropanol sont ajoutés à la solution, incubés 10 minutes à température ambiante et centrifugés à 12000g durant 10 minutes à 4°C. Cette étape permet à l'ARN de précipiter sous forme d'un culot translucide dans le fond du tube. Cependant, des sels provenant du Trizol sont toujours présents dans le culot d'ARN. C'est pourquoi, après élimination du surnageant, l'ARN est lavé avec 1 ml d'éthanol 75%. Cette étape de lavage de l'ARN se termine par une courte agitation au vortex suivie d'une centrifugation à 7500g durant 5 minutes à 4°C. Après séchage du culot sous la hotte, l'ARN est incubé 30 minutes à 37°C dans un mix contenant de la DNase. Après arrêt de la réaction par ajout d'une solution « stop », la solution est incubée à 37°C pendant 30 minutes et ensuite chauffée à 65°C pendant 10 minutes. Pour terminer, 9 µl d'eau RNase free sont ajoutés à l'échantillon pour obtenir un volume final de 20 µl. Enfin, la concentration des échantillons en ARN total est déterminée en mesurant la densité optique au spectrophotomètre à 260 nm, sachant qu'à cette longueur d'onde, une unité de densité optique correspond à 40 µg d'ARN/ml. Par ailleurs, la qualité de l'ARN total est testée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % (Gibco BRL) contenant 0.5% de bromure d'éthidium (BET, Sigma).

16.2. Transcription inverse (RT : reverse transcription)

La «reverse transcriptase», enzyme issue d'un rétrovirus, permet de synthétiser de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN cibles, en présence d'amorces « sens » appropriées et de nucléotides. Dans nos conditions expérimentales, 2 µg d'ARN de l'échantillon ou de la référence ont été dénaturés à 65°C pendant 8 minutes. Ensuite, l'ADNc simple brin a été synthétisé grâce à la transcriptase inverse Superscript II (40 U, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) à 42°C pendant une heure en présence de RNaseOUT (200 U, Invitrogen), de 0.3 µg de random hexamères (Invitrogen) et de nucléotides (dNTP, Promega) dans une solution tampon (RTB Buffer Invitrogen), ainsi qu'en présence de dithiothreitol (DTT) (Invitrogen).

Pour chaque échantillon, un test sans enzyme rétrotranscriptase est également réalisé comme contrôle négatif afin de vérifier une éventuelle contamination d'ADN génomique.

16.3. Amplification par PCR (polymerase chain reaction)

La PCR est réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 15 ng d'ARN total dans 1.5 µl de la réaction de RT et 18.5 µl de solution Master Mix (Taqman Universal PCR Master Mix - Applied Biosystems, USA) et de la sonde d'intérêt (Assay-on-Demand Expression probes - Applied Biosystems, USA) pour NOS2 (Applied Biosystems Rn00561646_m1, USA), NOS3 (Applied Biosystems Rn02132634_s1, USA) et l'ARN ribosomal 18S, choisi comme gène endogène (housekeeping gene) (Applied Biosystems, USA). Notons que l'expression du 18S dans le rein ne se modifie pas après I/R.

Les conditions de cycles consistent en une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 minutes puis 40 cycles à 95°C (dénaturation) pendant 15 secondes et à 60°C (hybridation/extension) pendant une minute. Chaque échantillon est analysé en triplicat. L'expression de chaque gène a été déterminée en utilisant la méthode comparative de Ct (Comparative Ct – $\Delta\Delta\text{Ct}$ – Method) (Livak *et al.*, 2001). Cette méthode est une quantification relative qui consiste à calculer des différences de taux d'expression en comparant les valeurs de Ct de chaque échantillon cible avec un calibrateur, correspondant à un échantillon de tissu non traité considéré comme référence. Ainsi, les valeurs de Ct pour chaque gène cible ainsi que pour la référence sont normalisées, en soustrayant la valeur de Ct du contrôle endogène (housekeeping gene - 18S), permettant d'obtenir une valeur ΔCt pour chaque échantillon, ainsi que pour la référence. Ensuite, les valeurs de ΔCt de chaque échantillon sont à nouveau normalisées en soustrayant celle de la référence (calibrateur), obtenant dès lors une valeur de $\Delta\Delta\text{Ct}$. Par conséquent, les valeurs de $\Delta\Delta\text{Ct}$ peuvent être soit positives, soit négatives. La dernière étape consiste donc à transformer ces valeurs en valeurs absolues : $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Les résultats finaux correspondent ainsi à des variations relatives du taux d'expression du gène cible, qui peuvent être comparées entre les différents groupes expérimentaux.

17. Statistiques

Les résultats présentés dans ce travail correspondent à des moyennes \pm SEM. Ces résultats ont été soumis à des tests statistiques :

- un test t de Student afin d'évaluer la différence statistique entre deux moyennes appartenant à deux groupes expérimentaux différents ;
- une analyse de variance (one way ANOVA) pour comparer les moyennes entre plus de deux groupes expérimentaux différents ;
- un test de variance pour mesures répétées (one way ANOVA RM) pour comparer plus de deux moyennes correspondant à différentes périodes expérimentales au sein d'un même groupe.
- en cas de signification statistique, l'analyse de variance a été complétée par un test de Dunnett's, Holm-Sidak ou Newmann Keuls permettant de mettre en évidence des différences par rapport aux valeurs contrôles au sein d'un même groupe ou des paires de moyennes statistiquement différentes les unes des autres.
- dans le cas de l'étude de l'évaluation fonctionnelle, aucune différence entre les animaux « SHAM » et les animaux « contrôles » n'a été observée. Ces deux groupes ont donc été fusionnés afin de faciliter l'analyse des résultats.

La limite de signification a été fixée à $P < 0.05$.

1. ETUDE DE LA FONCTION RÉNALE	27
1.1. CRÉATININÉMIE	27
1.2. DIURÈSE/OSMOLARITÉ	28
1.3. NATRIURÈSE ET KALIURÈSE	29
1.4. NGAL	30
2. INFLAMMATION	31
2.1. DOSAGE TISSULAIRE DU MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1 (MCP-1)	31
2.2. COMPTAGE ED-1	33
2.3. COMPTAGE CD-8	35
3. STRESS OXYDATIF	37
3.1. PEROXYDE D'HYDROGÈNE (H ₂ O ₂)	37
3.2. MDA	38
4. LE MONOXYDE D'AZOTE	39
4.1. EXCRÉTION URINAIRE DU NO	39
4.2. EXPRESSION ET RÉGULATION DES NO SYNTHASES	40
4.2.1. NOS2	40
4.2.2. NOS3	42

1. Etude de la fonction rénale

1.1. Créatininémie

La **Figure 22** illustre l'évolution de la créatininémie chez des rats Wistar Hanovre (WH) et des rats Wistar Furth (WF) à différents délais post-I/R. Les valeurs moyennes de la concentration plasmatique en créatinine plasmatique chez des animaux contrôles correspondent respectivement à $90.8 \pm 23.7 \mu\text{M}$ et $62.8 \pm 29.7 \mu\text{M}$, dans les groupes WH et WF (NS).

Chez les rats WH, la procédure d'I/R provoque une augmentation de la créatininémie, qui est statistiquement significative et maximale à 48h ($547.1 \pm 31.6 \mu\text{M}$ [$P < 0.05$]). La créatininémie diminue ensuite et se stabilise à partir du jour 7 post-I/R (168h) à des valeurs comparables à celles mesurées dans le groupe contrôle correspondant (NS).

Chez les rats WF, aucune augmentation significative de la créatininémie n'est observée au cours de la période d'observation, soit pendant les 14 jours post-I/R (336h), bien qu'une légère augmentation de la valeur moyenne puisse être mesurée à 48h.

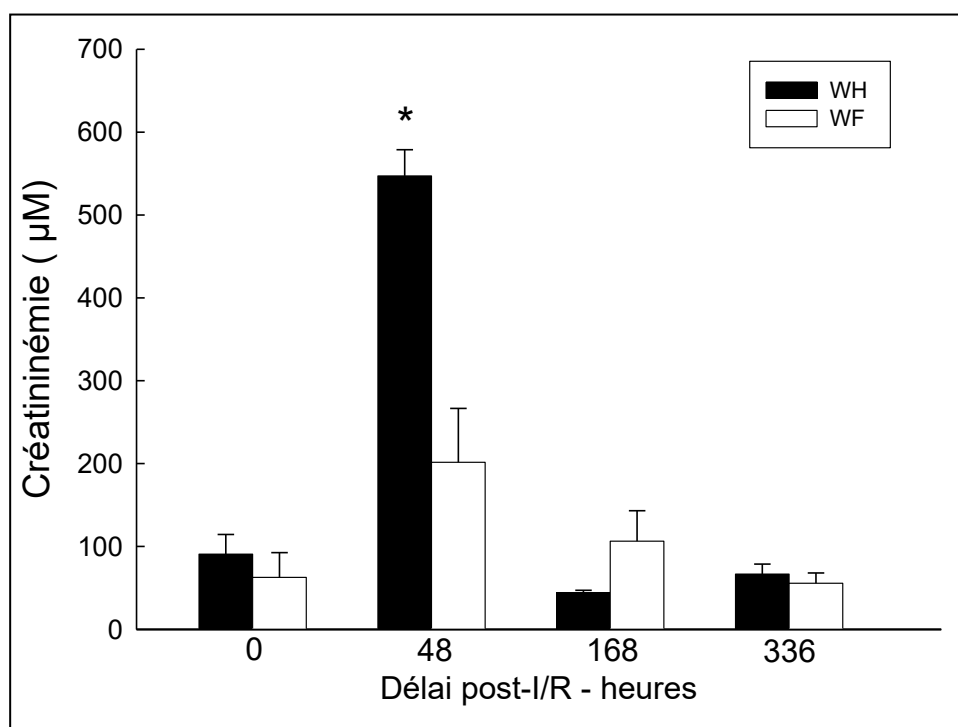


Figure 22: Evolution temporelle de la créatininémie, chez des rats Wistar Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF), en conditions « contrôles » (WH, n=6 ; WF, n=6), ainsi que 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (WH, n=6, 6, 6 ; WF, n=6, 6, 6).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique : * $P < 0.05$ (one-way Anova et test de Holm-Sidak versus groupe « Contrôle »).

1.2. Diurèse/osmolarité

Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus sur base des relevés en cages métaboliques ainsi que grâce aux analyses effectuées sur les échantillons urinaires récoltés quotidiennement. Pour rappel, pour chaque souche (WH ou WF), les animaux sont répartis en deux séries expérimentales : le groupe « contrôle » composé des animaux ayant subi la procédure *contrôle* et *sham*, et le groupe « I/R ».

La **Figure 23** illustre l'évolution temporelle de la diurèse et de l'osmolarité urinaire en conditions contrôles et en conditions post-ischémiques chez les rats WH et les rats WF sur une période de 14 jours.

- Chez les rats WH et les rats WF appartenant aux groupes « contrôles », la diurèse (**Figure 23a–23c**) et l'osmolarité urinaire (**Figure 23b–23d**) peuvent être considérées comme stables au cours de la période d'observation, même si quelques variations sont observées de manière ponctuelle.
- Chez les rats WH ayant subi une I/R, la diurèse augmente 48h après l'I/R (22.8 ± 2.2 ml/24h versus 13.8 ± 0.8 ml/24h [$P < 0.05$]), et reste significativement supérieure à sa valeur contrôle (J0) jusqu'au terme du protocole expérimental (**Figure 29a**). L'évolution temporelle de l'osmolarité urinaire (**Figure 23b**) se caractérise par une diminution significative observée dès les premières 24h après I/R (668 ± 100 μ M versus 1548 ± 98 μ M [$P < 0.05$]). Cette diminution tend à s'atténuer au cours du temps mais les valeurs moyennes restent néanmoins inférieures à la valeur contrôle (J0), l'osmolarité urinaire au jour 14 post-I/R correspondant à 1179 ± 102 μ M [$P < 0.05$].
- Chez les rats WF ayant subi une I/R, l'évolution temporelle de la diurèse après I/R tend à adopter un profil similaire à celui observé chez les rats WH (**Figure 23**). Toutefois, la phase d'accroissement de la diurèse au cours des premiers jours est plus prononcée. En effet, 48h après I/R, la diurèse atteint une valeur de 29.7 ± 2.2 ml/24h ($P < 0.05$) et est maximale au jour 4. Par la suite, la diurèse tend à revenir vers la valeur contrôle (J0). Bien que l'adaptation de la diurèse soit quantitativement plus importante chez les rats WF après I/R, le retour vers la valeur contrôle s'effectue plus rapidement que chez les rats WH. En ce qui concerne l'osmolarité urinaire, le profil temporel est similaire à celui décrit pour les rats WH mais l'ampleur des variations observées est à nouveau plus marquée. Ainsi, l'osmolarité est minimale à 24h post-I/R (426.4 ± 34.4 μ M versus 1558 ± 107 μ M pour la valeur contrôle [$P < 0.05$]) et augmente ensuite progressivement jusqu'à atteindre des valeurs proches de la valeur contrôle (1419 ± 71 μ M, $P < 0.05$).

1.3. Natriurèse et kaliurèse

La **Figure 24** illustre l'évolution temporelle de la natriurèse (excrétion urinaire du sodium par 24h), et de la kaliurèse (excrétion urinaire de potassium par 24h), en conditions contrôles et en conditions post-ischémiques chez les rats WH et les rats WF sur une période de 14 jours.

- Chez les rats WH et les rats WF appartenant aux groupes « contrôles », la natriurèse (**Figure 24a–24c**) et la kaliurèse (**Figure 24b–24d**) présentent quelques variations, parmi lesquelles on peut noter une diminution significative mais transitoire de ces deux variables au cours des premiers jours du protocole et ce, chez les rats WH.
- Chez les rats WH ayant subi une I/R, l'évolution temporelle de la natriurèse (**Figure 24a**) se caractérise par une diminution rapide au cours des premières 24h post-I/R, de 2.1 ± 0.2 à 0.6 ± 0.1 mEq/24h ($P < 0.05$). Cette réduction s'atténue au cours du temps mais les valeurs moyennes restent significativement inférieures à la valeur contrôle au cours des 4 premiers jours post-I/R ($P < 0.05$). D'une manière comparable au profil de la natriurèse, la kaliurèse diminue de 3.4 ± 0.2 à 1.4 ± 0.2 mEq/24h au cours des premières 24h post-I/R, ce qui représente environ 41.2% de la valeur contrôle (**Figure 24b**). Cette variation aiguë s'atténue progressivement de sorte que les valeurs mesurées à partir du jour 7 post-I/R sont similaires à la valeur contrôle.
- Chez les rats WF ayant subi une I/R, les variations de la natriurèse et de la kaliurèse après I/R (**Figure 24c et 24d**) présentent une évolution temporelle similaire à celle observée chez les rats WH, à la différence près que leur ampleur semble à nouveau être plus prononcée.

1.4. NGAL

La **Figure 25** illustre l'évolution de l'excrétion urinaire de NGAL chez des rats Wistar Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF) à différents délais post-I/R. En conditions contrôles (J0), l'excrétion urinaire de NGAL est similaire dans les deux groupes et correspond en moyenne à 5983 ± 1529 U/24h et 10138 ± 754 U/24h chez les rats WH et WF, respectivement. Dans les deux groupes expérimentaux considérés, la procédure d'I/R induit une augmentation de l'excrétion urinaire de NGAL, apparente dès les premières 12h qui suivent l'I/R (53924 ± 20532 U/24h chez les WH et 73276 ± 22619 U/24h chez les WF). Ce changement s'accroît et devient significatif à 24h pour les rats WH et à 48h chez les rats WF. Nous pouvons également remarquer que la valeur moyenne à 24h est significativement plus élevée chez les rats WH ($P < 0.045$).

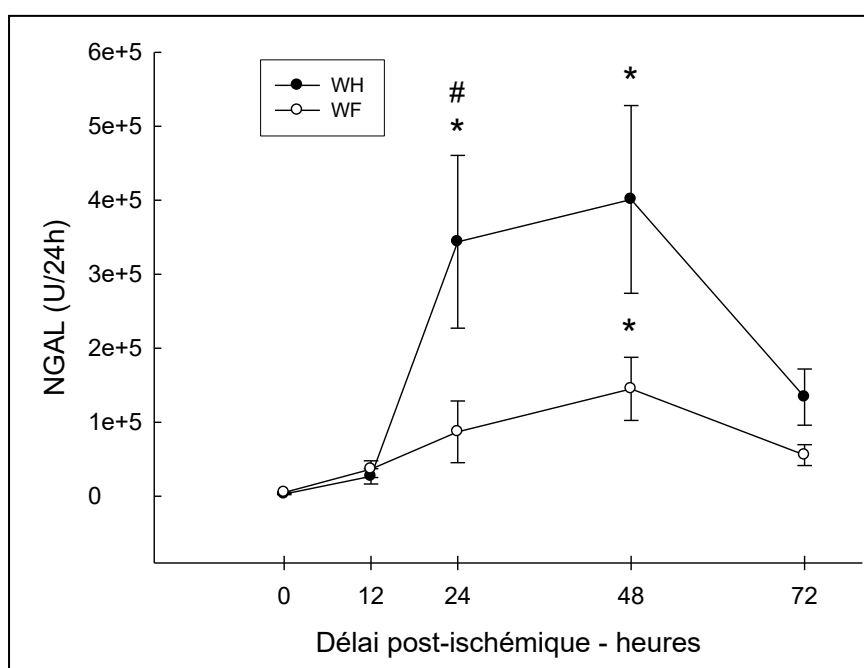


Figure 25: Evolution temporelle de l'excrétion urinaire de Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), en conditions contrôles, ainsi que 12h (n=6), 24h, 48h, 7 jours et 14 jours (WH, n=9 ; WF, n=11) après I/R, chez des rats Wistar Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique : * $P < 0.05$ (one-way Anova [$P < 0.017$] et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »), # $P < 0.05$ (one-way Anova test de t-student WF versus WH).

2. Inflammation

2.1. Dosage tissulaire du Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)

La **Figure 26** illustre la quantité de MCP-1 tissulaire mesurée dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM, chez des rats WH à différents délais post-I/R. Il apparaît ainsi que la quantité de MCP-1 produite dans le tissu augmente très rapidement après l'I/R dans les trois zones considérées. En effet, 12h après l'I/R, les valeurs mesurées correspondent à 1650 ± 128 pg/mg dans le cortex (vs 543 ± 78 pg/mg, $P < 0.05$), 1074 ± 100 pg/mg dans l'OSOM (vs 425 ± 43 pg/mg, $P < 0.05$) et 1162 ± 157 pg/mg dans l'ISOM (vs 173 ± 30 pg/mg, $P < 0.05$). Ensuite, la quantité de MCP-1 redevient rapidement comparable à la valeur contrôle dans le cortex, tandis que dans la médullaire (OSOM et ISOM), elles restent significativement élevée jusqu'à 24h post-I/R. A partir de 48h après l'I/R, la situation est comparable aux conditions contrôles, dans les trois zones étudiées.

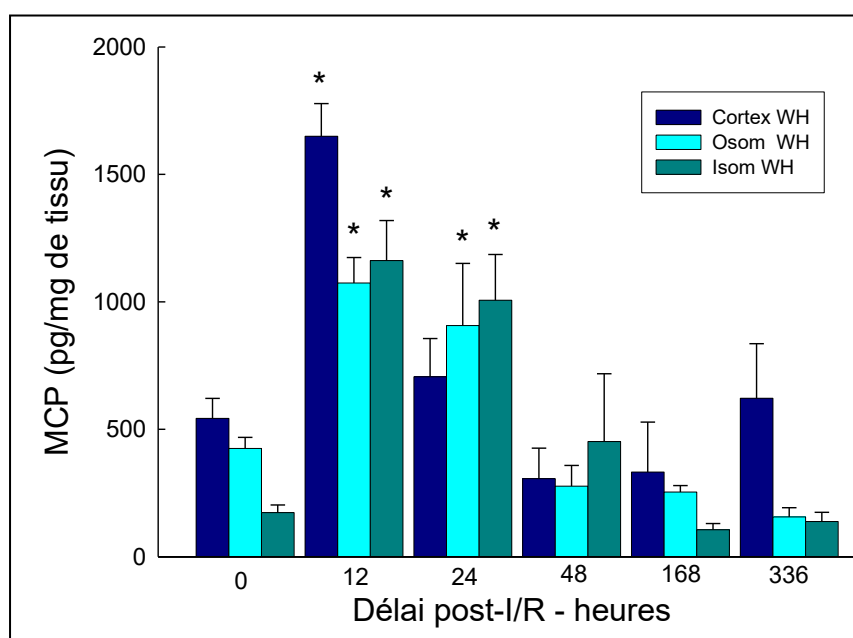


Figure 26: Evolution temporelle du taux de Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM, en conditions contrôles (n=6,8,8), ainsi que 12h, 24h, 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (12h, n=7,7,7 ; 24h n=7,5,6 ; 48h n= 8,5,5 ; 7j n=6,6,7 ; 14j n=6,7,6), chez des rats Wistar Hanovre (WH).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique : * $P < 0.05$ (One-way Anova [$P < 0.001$] et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

Chez les rats WF (**Figure 27**), la quantité de MCP-1 présente dans le tissu reste faible au cours des 12 premières heures post-I/R. Par comparaison aux observations effectuées chez les

rats WH, son augmentation est plus tardive et décalée de 12h. On observe ainsi, 24h après I/R, une quantité de MCP-1 significativement plus importante que dans le groupe « contrôle » et ce, dans les trois zones du rein étudiées (1495 ± 324 vs 313 ± 81 pg/mg dans le cortex, 896 ± 159 vs 344 ± 82 pg/mg dans l'OSOM et 903 ± 203 vs 123 ± 18 pg/mg dans l'ISOM ; $P < 0.05$). Dans le cortex, le taux de MCP-1 diminue ensuite, puis se stabilise jusqu'au terme de la période d'observation à des valeurs qui restent légèrement supérieures à celle du groupe « contrôle ». En revanche, dans l'OSOM, la quantité de MCP-1 diminue rapidement et redevient similaire à celle du groupe « contrôle » dès 48h post-I/R, alors que dans l'ISOM, cette situation n'est observée qu'à partir du jour 7 post-I/R.

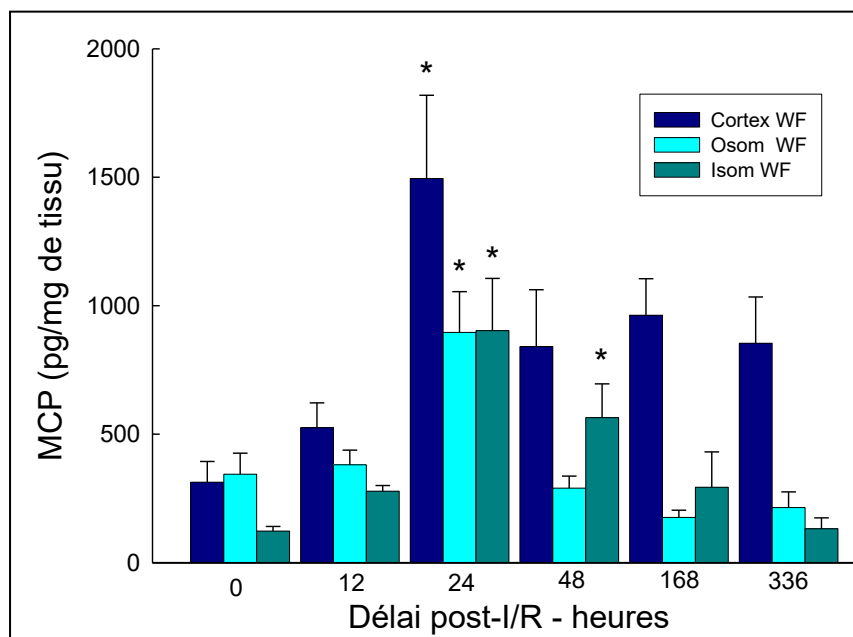


Figure 27: Evolution temporelle du taux de Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM, en conditions contrôles ($n=9,7,7$), ainsi que 12h, 24h, 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (12h, $n=7,7,7$; 24h, $n=8,7,7$; 48h $n=7,7,8$; 7j, $n=8,7,6$; 14j, $n=7,6,6$), chez des rats Wistar Furth (WF).

Résultats= Moyenne \pm SEM. Signification statistique : * $P < 0.05$ (One-way Anova [$P < 0.001$] et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

2.2. Comptage ED-1

Cette partie des résultats concerne l'analyse de la distribution des cellules ED-1 positives présentes dans le tissu, à savoir les monocytes et les macrophages. La **Figure 28** illustre cette distribution dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM chez des rats WH, en conditions contrôles et en conditions post-ischémiques. Dès 48h après I/R, le nombre de cellules ED-1 positives augmente significativement dans l'OSOM (nombre de cellules par mm^2 : 317 ± 96 vs 37 ± 7 dans le groupe contrôle [$*P<0.05$]) et dans l'ISOM (nombre de cellules par mm^2 : 245 ± 57 vs 39 ± 12 dans le groupe « contrôle » [$*P<0.05$]). Le nombre maximal de cellules ED-1 positives est observé au jour 7 dans les trois zones du rein (693 ± 313 dans le cortex ; 1070 ± 255 dans l'OSOM ; 749 ± 231 dans l'ISOM ; $P<0.05$). Cette population cellulaire devient progressivement moins importante dans le tissu post-ischémique et présente au jour 14 une densité légèrement supérieure à celle mesurée dans le groupe « contrôle », quelle que soit la zone considérée (NS vs groupe contrôle).

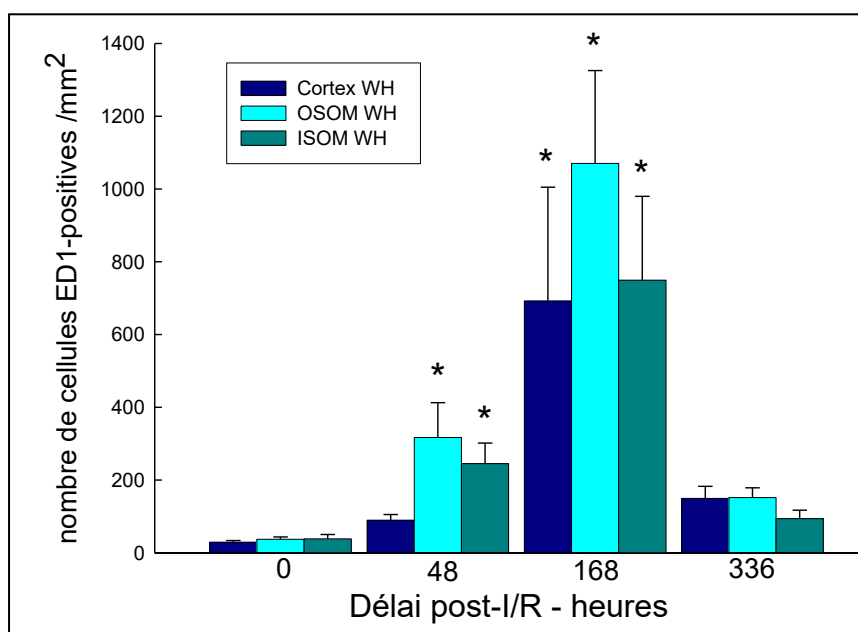


Figure 28: Evolution temporelle du nombre de cellules ED-1 positives dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM, en conditions contrôles (n=6), ainsi que 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (n=6, 6, 6), chez des rats Wistar Hanovre (WH).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique : $*P<0.05$ (one-way Anova [$P<0.005$] et Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

L'évolution de la population des cellules ED-1 positives mesurée chez les rats WF est illustrée dans la **Figure 29**. Ce profil est similaire à celui décrit ci-dessus chez les rats WH, et se caractérise par l'augmentation du nombre de monocytes/macrophages par mm^2 de tissu dès 48h après I/R dans l'OSOM et dans l'ISOM, qui atteint des valeurs maximales au jour 7 post-I/R dans les trois zones du rein (nombre de cellules par mm^2 dans le cortex : 410 ± 75 vs 31 ± 4 dans le groupe « contrôle » ; dans l'OSOM : 649 ± 153 vs 31 ± 4 dans le groupe contrôle ; dans l'ISOM : 494 ± 100 vs 21 ± 2 dans le groupe « contrôle » ; $P < 0.05$). Un retour à des valeurs proches de celle mesurée dans le groupe « contrôle » est observé au jour 14 post-I/R (NS), bien que le nombre de monocytes/macrophages semble néanmoins rester légèrement supérieur à celui qui caractérise un tissu normal. Enfin, notons que, du point de vue quantitatif, il semble que les rats WH présentent, au jour 7 post-I/R, un infiltrat inflammatoire un peu plus important que celui observé chez les rats WF.

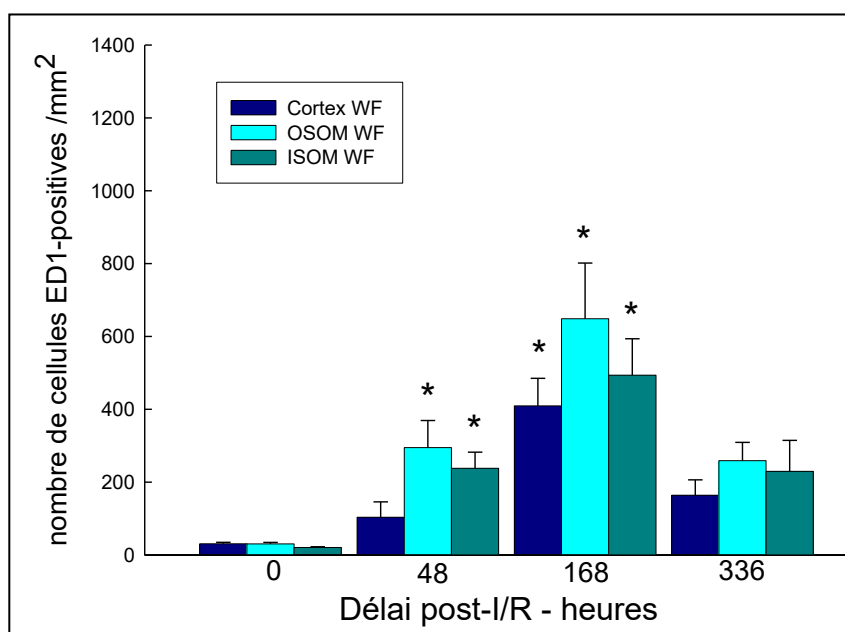


Figure 29: Evolution temporelle du nombre de cellules ED-1 positives dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM, en conditions contrôles (n=6), ainsi que 12h, 24h, 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (n=6, 6, 6), chez des rats Wistar Furth (WF).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique : * $P < 0.05$ (one-way Anova [$P < 0.005$] et Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

2.3. Comptage CD-8

La **Figure 30** illustre l'évolution du nombre de cellules CD-8 positives dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM chez des rats WH, en conditions contrôles et en conditions post-ischémiques. Aucune différence significative n'est observée dans le cortex des rats WH au cours de la période d'observation, alors que dans l'OSOM, le nombre de cellules CD-8 positives reste faible au cours des premières 48h post-I/R (nombre de cellules par mm^2 : 47 ± 11 vs 24 ± 4 dans le groupe « contrôle »), puis augmente de manière significative au jour 7 post-I/R (nombre de cellules par mm^2 : 96 ± 18). Cette valeur diminue ensuite et redevient comparable à celle du groupe contrôle. Dans l'ISOM, un pic est observé à 48h post-I/R bien que celui-ci ne présente aucune valeur significative. Il est suivi d'une diminution progressive au jour 7 et finalement d'un retour à une valeur moyenne proche de celle du groupe « contrôle ».

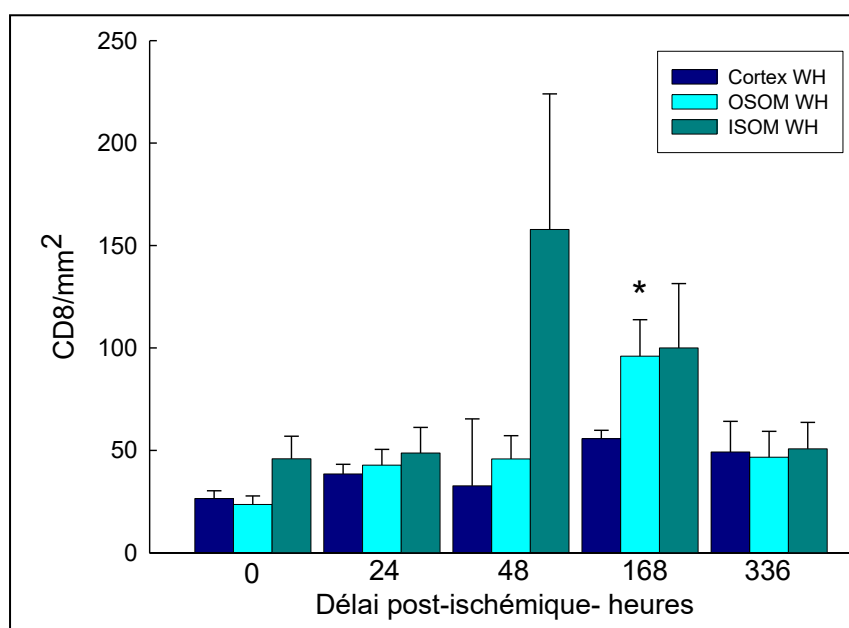


Figure 30: Evolution temporelle du nombre de cellules CD-8 positives dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM, en conditions contrôles (n=6), ainsi que 24h, 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (n= 6, 6, 6, 6), chez des rats Wistar Hanovre (WH). Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique: *P<0.05 (one-way Anova [P<0.003] et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

Chez les rats WF (**Figure 31**), aucune modification du nombre de cellules CD-8 positives n'est observée dans le cortex et dans l'OSOM au cours du protocole expérimental. En revanche, dans l'ISOM, une augmentation transitoire et statistiquement significative du nombre de cellules CD-8 positives est détectée 48h après I/R (nombre de cellules par mm² : 122 ± 18 vs 27 ± 7 dans le groupe « contrôle »). Les rats WF semblent donc présenter un infiltrat de lymphocytes CD-8 plus transitoire, ne se produisant que dans l'ISOM.

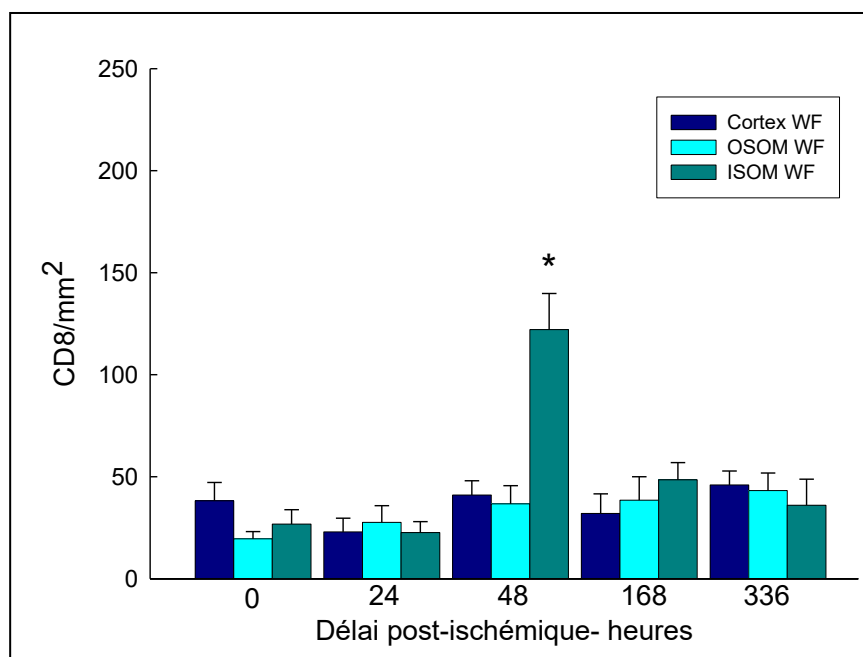


Figure 31: Evolution temporelle du nombre de cellules CD-8 positives dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM, en conditions contrôles (n=6), ainsi que 24h, 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (n=6, 6, 6), chez des rats Wistar Furth (WF).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique: *P<0.05 (one-way Anova [P<0.003] et test de Holm Sidak versus groupe « contrôle »).

3. Stress oxydatif

3.1. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Comme l'illustre la **Figure 32**, l'excrétion urinaire de H₂O₂ (exprimée par mg de créatinine urinaire [Cr]) mesurée chez les rats WH augmente de manière significative 24h après l'I/R par comparaison avec la valeur contrôle (60 ± 15 vs 7 ± 2 nmole/mg Cr, $P < 0.05$). L'excrétion d'H₂O₂ diminue ensuite pour se stabiliser à des valeurs légèrement supérieures à la valeur contrôle (NS).

Chez les rats WF, le profil observé est similaire à celui décrit ci-dessus pour les rats WH. L'excrétion urinaire de H₂O₂ atteint des valeurs maximales 24h après I/R (132 ± 44 vs 13 ± 3 nmole/mg Cr pour la valeur contrôle, $P < 0.05$) et rejoint ensuite la valeur contrôle à partir du jour 7 (16 ± 6 nmole/mg Cr, NS).

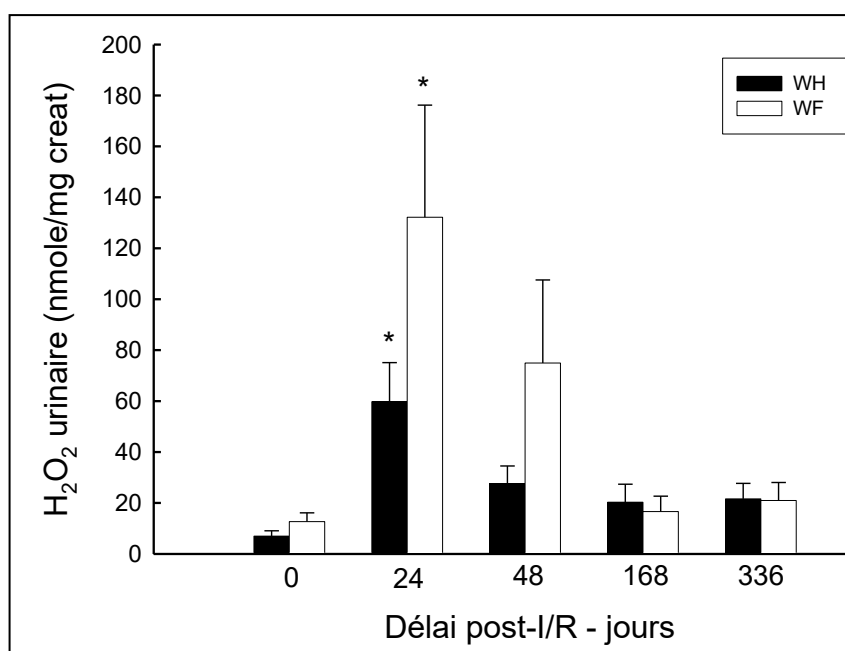


Figure 32: Evolution temporelle de l'excrétion urinaire de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en conditions contrôles, ainsi que 24h, 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (WH, n=9 ; WF, n=11), chez des rats Wistar Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique: * $P < 0.05$ (one-way Anova RM [$P < 0.01$] et test de Newman-Keuls versus valeur contrôle = J0).

3.2. MDA

La **Figure 33** illustre l'excrétion urinaire de MDA (exprimée par mg de créatinine urinaire [Cr]) chez des rats WH et des rats WF en conditions contrôles et ischémiques.

Chez les rats WH, l'excrétion urinaire de MDA augmente rapidement pour atteindre, 24h après l'I/R, une valeur significativement supérieure à celle de la valeur contrôle (47.9 ± 25.4 vs 2.9 ± 0.8 nmole/mg Cr, $P < 0.05$). Ces concentrations déclinent ensuite et retournent à des valeurs proches de la valeur contrôle à partir du jour 7 post-I/R (6.2 ± 1.3 nmole/mg Cr, NS).

Du point de vue qualitatif, les rats WF présentent un profil similaire, caractérisé par une excrétion urinaire de MDA maximale à 24h post-I/R (25.4 ± 14.4 vs 1.9 ± 0.5 nmole/mg Cr pour la valeur contrôle), suivie d'une diminution progressive jusqu'au terme du protocole expérimental.

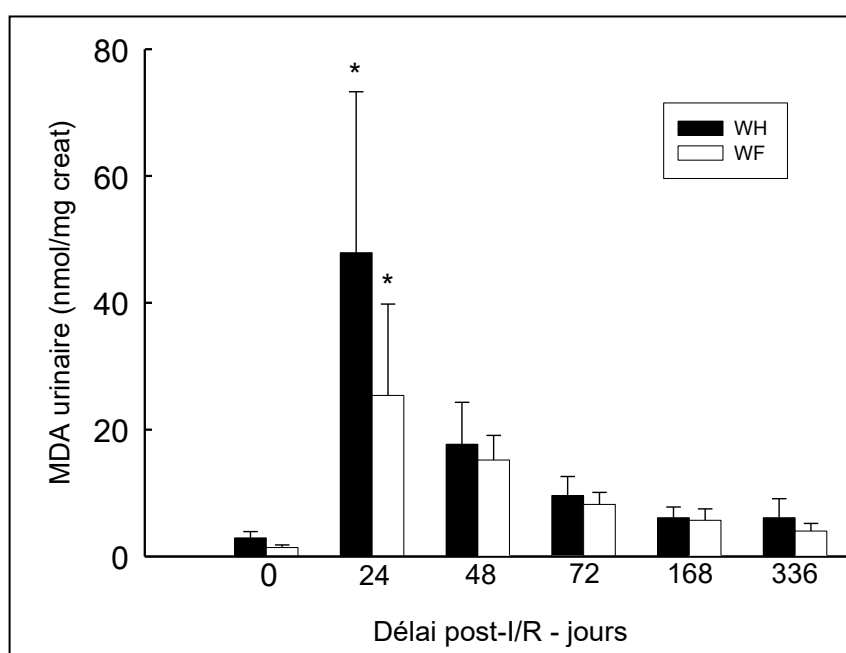


Figure 33: Evolution temporelle de l'excrétion urinaire de malonedialdéhyde (MDA), en conditions contrôles, ainsi que 24h, 48h, 7 jours et 14 jours après I/R (WH, n=9 ; WF, n=11), chez des rats Wistar Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique: * $P < 0.05$ (one-way Anova RM [$P < 0.008$] et Holm-Sidak versus valeur contrôle = J0).

4. Le monoxyde d'azote

4.1. Excrétion urinaire du NO

La **Figure 34** illustre l'évolution temporelle de l'excrétion urinaire des NOx mesurée avant (conditions contrôles) et 48h, 7 et 14 jours après I/R, chez les rats WH et les rats WF.

L'analyse des résultats révèle une diminution significative de l'excrétion des NOx 48h après I/R, chez les deux souches (4.0 ± 1.3 vs 7.0 ± 0.4 $\mu\text{mole}/24\text{h}$ pour la valeur contrôle chez les rats WH ; 3.1 ± 0.8 vs 6.2 ± 0.4 $\mu\text{mole}/24\text{h}$ pour la valeur contrôle chez les rats WF). Au jour 7 post-I/R, l'excrétion urinaire des NOx reste légèrement inférieure aux valeurs contrôles, ce qui représente respectivement 70% chez les rats WH et 82% chez les rats WF. Des valeurs comparables aux valeurs contrôles sont atteintes au jour 14 post-I/R (6.3 ± 0.9 vs 7.0 ± 0.4 $\mu\text{mole}/24\text{h}$ chez les rats WH ; 7.0 ± 0.5 vs 6.2 ± 0.4 $\mu\text{mole}/24\text{h}$ chez les rats WF).

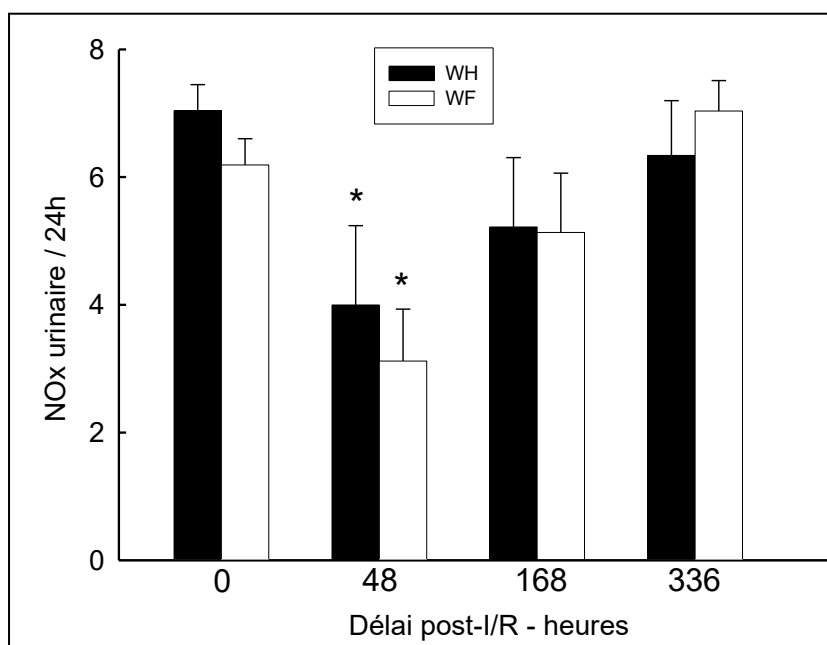


Figure 34: Evolution temporelle de l'excrétion urinaire des métabolites du NO (NOx), en conditions contrôles, ainsi que 48h, 7 jours et 14 jours après I/R, chez des rats Wistar Hanovre (WH, n= 9) et Wistar Furth (WF, n= 11).

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique: *P<0.05 (one-way Anova RM [P<0.05] et test de Dunnett's versus valeur contrôle = J0).

4.2. Expression et régulation des NO synthases

Cette partie des résultats concerne l'évaluation de l'expression tissulaire des gènes codant pour les NOS2 et NOS3, mesurée par RT-PCR quantitative à différents délais post-ischémiques ainsi que dans des conditions contrôles.

4.2.1. NOS2

La **Figure 35** illustre l'expression des ARNm codant pour la NOS2 mesurée sur des échantillons tissulaires de l'OSOM à différents délais post-ischémiques. Ces valeurs ont été exprimées sous forme de valeurs relatives, les valeurs contrôles ayant été considérées comme une référence, fixée à 1.

Chez les rats WH, l'expression de NOS2 tend à augmenter 48h après I/R (NS), puis se stabilise jusqu'au terme de la période d'observation au jour 14, à des valeurs légèrement supérieures à celles mesurées dans le tissu contrôle (NS). Chez les rats WF, l'expression de NOS2 s'accroît tout au long de la période d'observation mais reste néanmoins non significative par comparaison avec la valeur contrôle.

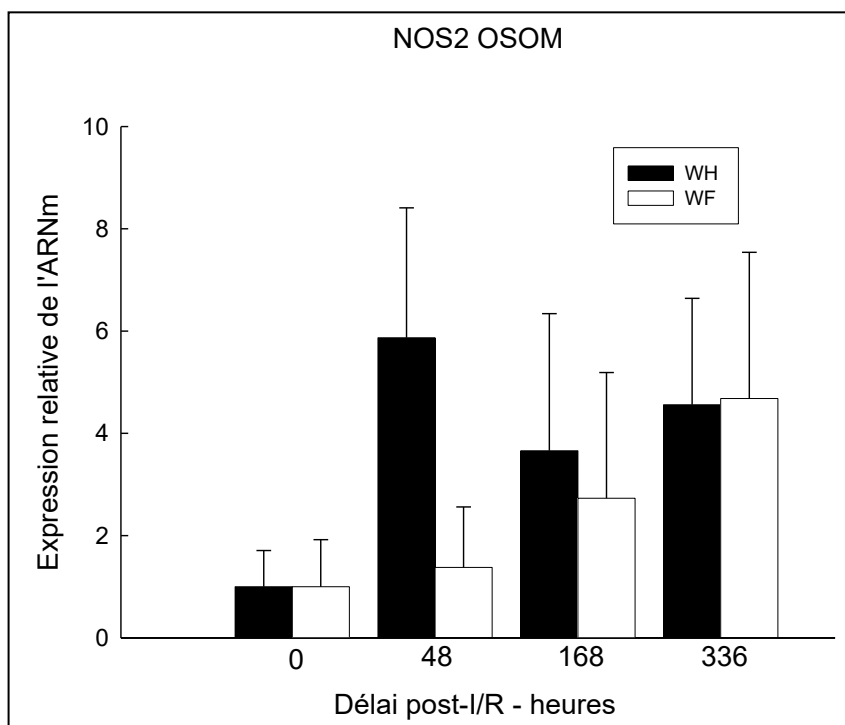


Figure 35: Evolution temporelle de l'expression relative des gènes codant pour NOS2 dans l'OSOM, en conditions contrôles (WH, n=6 ; WF, n=6) ainsi que 48h (WH, n=6 ; WF, n=4), 7 jours (WH, n=6 ; WF, n=4) et 14 jours (WH, n=6 ; WF, n=6) après I/R, chez des rats Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF).
Résultats = Moyenne \pm SEM. (One-way Anova et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

La **Figure 36** illustre l'expression des ARNm codant pour NOS2 mesurées sur des échantillons tissulaires dans l'ISOM. Chez les rats WH, l'expression de NOS2 augmente rapidement et significativement, d'un facteur 2.3 ± 1.0 , 48h après I/R. Au jour 7, son expression diminue pour ensuite augmenter à nouveau de manière non significative au jour 14. Chez les rats WF, on observe un profil d'expression similaire d'un point de vue qualitatif, caractérisé par une augmentation à 48h, suivie d'une diminution au jour 7. Cependant, d'un point de vue quantitatif, les rats WF présentent une expression de NOS2 plus faible, se rapprochant de la valeur mesurée dans le tissu contrôle. Aucune variation n'est ainsi significative chez ces animaux.

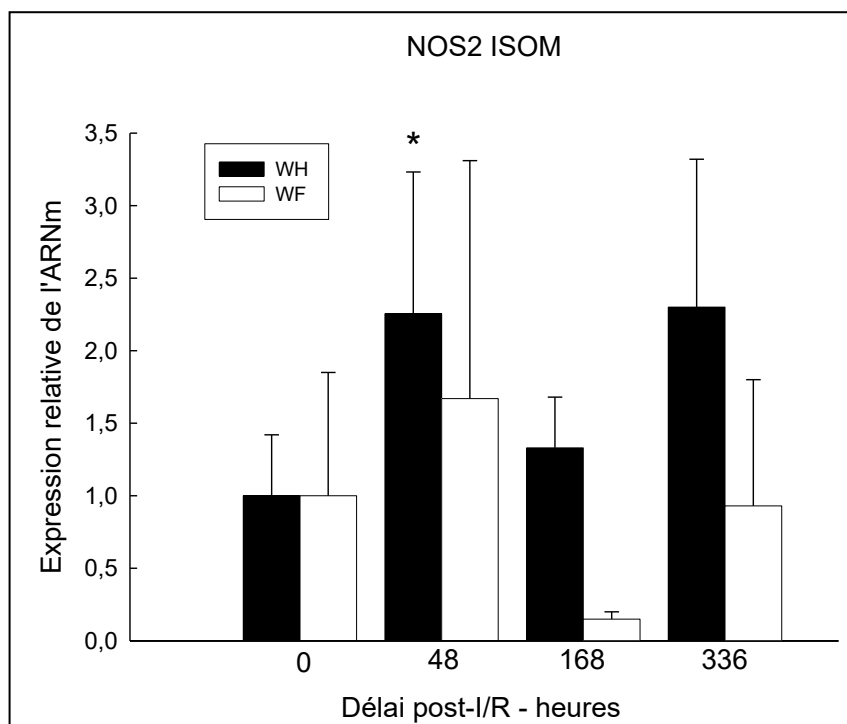


Figure 36: Evolution temporelle de l'expression relative des gènes codant pour NOS2 dans l'ISOM, en conditions contrôles (WH, n=6 ; WF, n=6) ainsi que 48h (WH, n=6 ; WF, n=4), 7 jours (WH, n=6 ; WF, n=4) et 14 jours (WH, n=6 ; WF, n=6) après I/R, chez des rats Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF)

Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique : *P<0.05 (One-way Anova et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

4.2.2. NOS3

La **Figure 37** illustre l'expression des ARNm codant pour la NOS3 mesurée sur des échantillons tissulaires de l'OSOM à différents délais post-ischémiques. Ces valeurs ont été exprimées sous forme de valeurs relatives, les valeurs contrôles ayant été considérées comme une référence, fixée à 1.

Chez les rats WH, l'expression de NOS3 n'augmente significativement qu'7 jours après l'I/R (2.6 ± 0.7 fois la valeur contrôle) et diminue ensuite pour retourner à des valeurs comparables à celles mesurées dans le tissu contrôle. Chez les rats WF, l'expression de NOS3 n'augmente également qu'au jour 7 post-I/R mais se maintient, au jour 14 post I/R, à des valeurs significativement supérieures à celles du tissu contrôle.

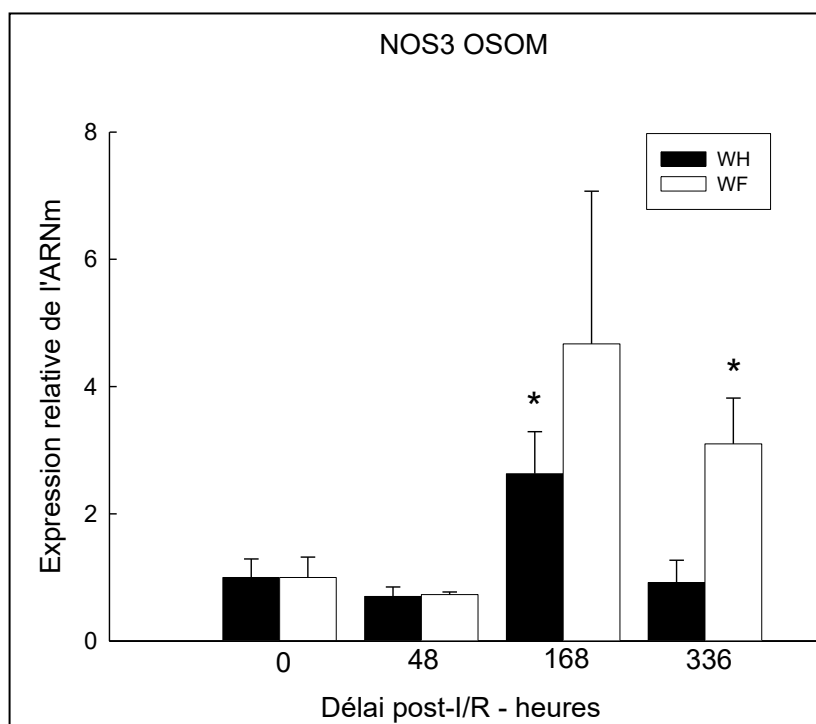


Figure 37: Evolution temporelle de l'expression relative des gènes codant pour NOS3 dans l'OSOM, en conditions contrôles (WH, n=6 ; WF, n=6) ainsi que 48h (WH, n=6 ; WF, n=4), 7 jours (WH, n=6 ; WF, n=4) et 14 jours (WH, n=6 ; WF, n=6) après I/R, chez des rats Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF) . Résultats = Moyenne \pm SEM. Signification statistique : * $P < 0.05$ (One-way Anova [$P < 0.018$] et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

La **Figure 38** illustre l'expression des ARNm codant pour NOS3 mesurée sur des échantillons tissulaires dans l'ISOM à différents délais post-ischémiques. Chez les rats WH, l'expression de NOS3 diminue significativement 48h après l'I/R, et se maintient ensuite à des valeurs inférieures à celles mesurées dans le tissu contrôle. Cette expression de NOS3 augmente ensuite et rejoint la valeur du groupe « contrôle » au jour 14 post-I/R. Chez les rats WF, on observe également une diminution importante de l'expression de NOS3 48h après l'I/R. Celle-ci est suivie d'un retour à des valeurs comparables à celle du groupe « contrôle » au cours du temps. Néanmoins, aucune variation significative n'a été décelée chez les rats WF au cours de la période expérimentale étudiée.

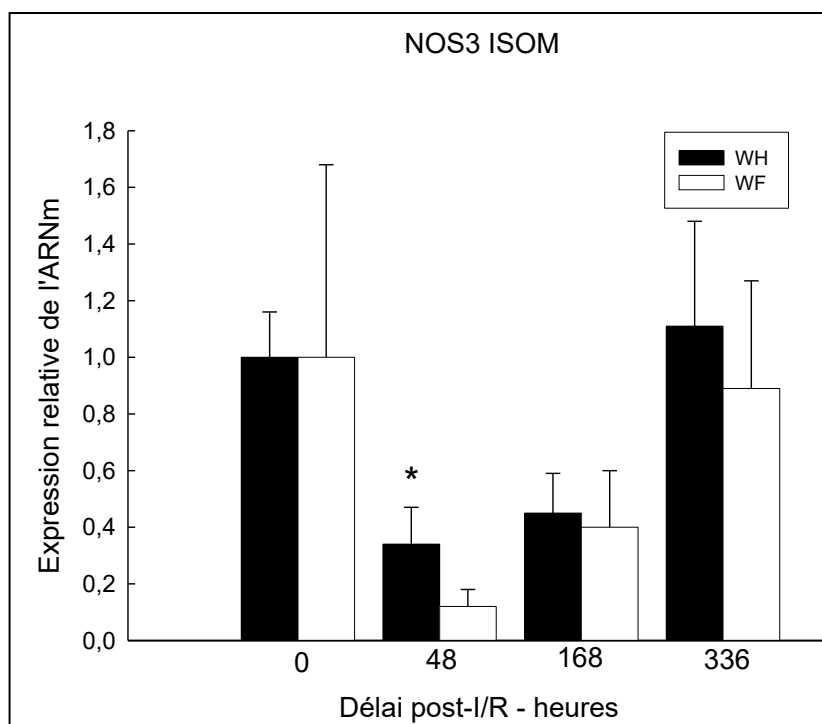


Figure 38: Evolution temporelle de l'expression relative des gènes codant pour NOS3 dans l'ISOM, en conditions contrôles (WH, n=6 ; WF, n=6) ainsi que 48h (WH, n=6 ; WF, n=4), 7 jours (WH, n=6 ; WF, n=4) et 14 jours (WH, n=6 ; WF, n=6) après I/R, chez des rats Hanovre (WH) et Wistar Furth (WF). Résultats = Moyenne ± SEM. Signification statistique : *P<0.05 (One-way Anova [P<0.012] et test de Holm-Sidak versus groupe « contrôle »).

1. ETUDE DE LA FONCTION RÉNALE	44
1.1. CRÉATININÉMIE	44
1.2. DIURÈSE, OSMOLARITÉ, NATRIURÈSE ET KALIURÈSE	45
1.3. NGAL	46
2. INFLAMMATION	47
2.1. DOSAGE MCP-1 ET MACROPHAGES	47
2.2. COMPTAGE CD-8.....	48
3. STRESS OXYDATIF	48
3.1. PEROXYDE D'HYDROGÈNE (H ₂ O ₂)	49
3.2. MDA	49
4. MONOXYDE D'AZOTE.....	49
4.1. EXCRÉTION URINAIRE DU NO	50
4.2. EXPRESSION ET RÉGULATION DES NO SYNTHASES	50
4.2.1. NOS2	50
4.2.2. NOS3	51
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	51

Les expériences effectuées au cours de ce travail de fin d'étude avaient pour finalité de préciser certains facteurs et processus impliqués dans l'étiologie des altérations morpho-fonctionnelles associées à l'ischémie/reperfusion rénale (I/R).

L'analyse et la discussion des résultats expérimentaux, en relation avec les données de la littérature sont abordées ci-dessous, avant de citer les perspectives qui nous ont semblé les plus pertinentes.

1. Etude de la fonction rénale

La première partie de cette étude a été consacrée à l'évolution de la fonction rénale post-ischémique chez deux souches de rats, Wistar Hanovre (WH), et Wistar Furth (WF), cette dernière présentant une capacité de résistance au développement d'une insuffisance rénale chronique (IRC) induite dans différents modèles (Erdely *et al.*, 2003, 2004, 2006).

1.1. Créatininémie

Les études effectuées *in vivo* et qui s'intéressent à la physiologie et à la physiopathologie rénales nécessitent d'évaluer la fonction du rein, selon différentes méthodes. Cette fonction est notamment caractérisée par le débit de filtration glomérulaire (DFG), reflété par la concentration en créatinine plasmatique. Ce produit métabolique endogène représente constitue un bon marqueur du DFG. En effet, il est filtré librement, n'est ni sécrété, ni absorbé le long du néphron, n'est pas métabolisé par le rein et ne présente aucun effet toxique. De plus, en conditions physiologiques, sa concentration est très stable.

En accord avec Donnahoo *et al.* (1999), nous avons pu constater que chez les rats WH, l'I/R se caractérise par une augmentation importante de la concentration de la créatinine plasmatique qui s'accroît d'un facteur 5, 48 h après I/R. Cette augmentation est ensuite suivie d'une diminution progressive et finalement d'un retour aux valeurs contrôles dès le jour 7, comme constaté par Declèves *et al.* (2006). L'insuffisance rénale, qui se traduit par une augmentation de la créatininémie, survient suite au développement de lésions tubulaires localisées essentiellement au niveau des segments S3 des tubules proximaux (Declèves *et al.*, 2006). La perte des bordures en brosses des cellules épithéliales ainsi que les débris cellulaires vont s'accumuler dans la lumière tubulaire et progressivement l'obstruer (Devarajan, 2006). Cette obstruction induit une augmentation de la pression hydrostatique dans l'espace de Bowman du corpuscule rénal, ce qui a pour effet de réduire le DFG. D'autres processus peuvent également contribuer à la diminution du DFG, tels qu'une augmentation de la résistance vasculaire de l'artériole afférente. Or, après I/R, une vasoconstriction afférente importante se développe suite à des lésions endothéliales. (Brenner, 2008).

Dès la première semaine après l'I/R se mettent en place de nombreux processus de régénération (Declèves *et al.*, 2006) qui expliquent la réparation complète de la majorité des cellules proximales au jour 14 (Vanstherthem *et al.*, 2008). Ces processus de régénération peuvent expliquer le retour de la créatininémie à des valeurs normales dès le jour 7 post-I/R.

Bien qu'une augmentation de la créatininémie s'observe également chez les rats WF, elle n'est toutefois pas significative. Chez cette même souche, Erdely *et al.*, (2004) ne rapporte que très peu de lésions ainsi qu'un maintien de la fonction rénale après induction d'une IRC par la puromycine et les aminonucléosides. De plus, ces mêmes auteurs (Erdely *et al.*, 2003) ont constaté que les rats WF disposaient d'environ 30% de glomérules en plus que les rats WH. Cette différence s'accompagne également d'une réponse compensatoire d'hyperfiltration en réponse à une réduction sévère de la masse rénale, qui pourrait expliquer l'atteinte fonctionnelle moins sévère observée dans ce modèle d'IRC. Il pourrait en être de même au cours d'IRA post-

ischémique, une atténuation de la réduction du DFG pouvant ainsi être associée à une diminution des lésions, un nombre plus élevé de glomérules ou une réponse compensatoire mieux adaptée.

1.2. Diurèse, osmolarité, natriurèse et kaliurèse

L'analyse des résultats obtenus sur base des échantillons urinaires récoltés chez des animaux placés en cages métaboliques révèle une augmentation rapide de la diurèse après I/R, associée à une diminution de l'osmolarité. Cette variable, qui reflète la concentration des urines, est déterminée par la présence dans l'urine de composés osmotiquement actifs, tels que le sodium et le potassium pour lesquels nous avons également observé une réduction de l'excrétion urinaire dès 24 h après I/R. Ainsi, au cours des premiers jours qui suivent l'ischémie, des altérations marquées de la diurèse associées à des modifications de l'osmolarité et de l'excrétion urinaire de sodium et de potassium se manifestent et tendent à se normaliser par la suite. Selon Fernandez-Llama *et al.* (1999), l'origine de ces altérations de la concentration urinaire provient d'un déséquilibre entre le DFG et la réabsorption tubulaire de l'eau, dont l'origine peut être multifactorielle.

Il a notamment été montré que les tubules proximaux (essentiellement au niveau des segments S3), ainsi que les anses de Henlé, sont les segments tubulaires les plus affectés après I/R. Or, les tubules proximaux sont le site de réabsorption d'environ 2/3 du NaCl filtré, un processus assuré par divers types de membranaires, parmi lesquels on peut citer l'échangeur Na^+/H^+ (Kwon *et al.*, 2000), dont le fonctionnement nécessite le maintien d'un gradient de concentration du sodium entre les milieux intra- et extracellulaire. Cette fonction est assurée par un transport actif, les pompes Na-K-ATPase, dont l'activité et la localisation sont altérées après I/R. Dès lors, ces pompes deviennent incapables de transporter efficacement le sodium hors de la cellule (Kwon *et al.*, 2000). En conséquence, la quantité de NaCl qui transite dans le tubule distal, le long de la macula densa, sera augmentée et aura pour effet d'activer le rétro-contrôle tubuloglomérulaire afin de réduire le DFG et donc d'éviter les pertes excessives de NaCl (Kwon *et al.*, 1999). Malgré la mise en place de ces divers mécanismes visant à éviter les pertes excessives de sodium, son excrétion fractionnelle va néanmoins augmenter. Cette perte de sodium plus importante par rapport à sa charge filtrée s'accompagne d'une excrétion d'eau accrue, conduisant à une augmentation de la diurèse et à une diminution de l'osmolarité urinaire.

Une partie du NaCl est également réabsorbée au niveau de la branche ascendante large de l'anse de Henlé. En particulier, l'I/R engendre une diminution de l'expression de certains transporteurs dans ces segments tels que le cotransporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ qui permet l'entrée de NaCl dans la cellule tubulaire (Kwon *et al.*, 2000). Or cette réabsorption sodique est essentielle pour la récupération du sodium d'une part, mais également pour assurer le maintien d'un gradient osmotique cortico-papillaire essentiel au mécanisme de concentration des urines. Celui-ci se met en place dans l'interstitium localisé entre la branche ascendante large de l'anse de Henlé et la branche descendante de l'anse de Henlé (Fernandez-Llama *et al.*, 1999).

Un autre segment tubulaire impliqué dans la concentration urinaire est le tube collecteur qui, en fonction de la mise en place d'aquaporines dans la membrane apicale de l'épithélium va pouvoir moduler l'absorption de l'eau. Les aquaporines sont des protéines de membranes intégrales qui permettent le transport passif de l'eau aux travers des membranes plasmiques sous l'action de l'ADH (Hormone antidiurétique). Or, Fernandez-Llama *et al.* (1999) ont identifié une diminution de leur abondance consécutive à une I/R (Fernandez-Llama *et al.*, 1999). Divers processus pourraient être impliqués dans ce mécanisme : Schmidt *et al.* (2007) citent notamment la production de cytokines qui semblent être capables de diminuer l'expression de certains isoformes d'aquaporines après I/R (Schmidt *et al.*, 2007).

Par ailleurs, il est également important de s'intéresser au bilan hydro-électrolytique de l'animal après I/R et de signaler à cet égard que la réduction de l'excrétion de sodium et de potassium peut également être due à une diminution de l'apport alimentaire, telle que nous l'avons observée au cours des premiers jours qui suivent la procédure opératoire.

Au cours de cette étude, une réduction de l'excrétion de potassium a également été observée après I/R. Celle-ci provient d'une part de la diminution du DFG, mais également de modifications de la régulation du bilan-hydro-électrolytique. En effet, en condition physiologique, 80% du potassium filtré est réabsorbé au niveau du tubule proximal. L'ajustement de son excrétion, en fonction des besoins de l'organisme, s'effectue dans les tubules distaux et les tubules collecteurs corticaux, où sa sécrétion est régulée par des mécanismes dépendants de l'aldostérone. C'est ainsi qu'après I/R, l'augmentation de la concentration en sodium plasmatique, associée à l'accroissement de la pression artérielle, va inhiber la sécrétion d'aldostérone, ce qui réduit la sécrétion de potassium au niveau des tubules distaux et collecteurs (Valtin, 1983). Les observations réalisées au cours de ce travail pourraient suggérer qu'au cours des premiers jours d'IRA, les rats WF pourraient diminuer leur sécrétion d'aldostérone, expliquant ainsi la diminution plus importante de l'excrétion potassique.

L'origine des différences fonctionnelles observées entre les rats WH et les rats WF pourrait provenir de certaines modifications du métabolisme du NO qui seront abordées au cours de cette discussion dans la partie traitant de ce médiateur. En effet, de par son action vasodilatatrice, le NO est capable de modifier le DFG et peut influencer également les transports tubulaires auxquels nous nous sommes intéressés.

1.3. NGAL

L'utilisation de la créatininémie comme indicateur du DFG présente un certain nombre de limitations, notamment un certain retard dans l'apparition de variations significatives par rapport au développement des atteintes fonctionnelles sous-jacentes et un manque de spécificité quant à l'origine de ces variations quantitatives. L'identification de nouveaux biomarqueurs en néphrologie de la fonction rénale s'avère donc particulièrement importante pour faciliter le diagnostic et le pronostic de l'insuffisance rénale. En particulier, le NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin), une protéine dont l'expression est fortement augmentée après I/R et dont l'augmentation traduit le développement d'une IRA, fait actuellement l'objet d'une attention tout particulière. Son dosage urinaire chez l'animal étant disponible depuis peu, nous l'avons évalué dans nos conditions expérimentales.

En condition physiologique, de faibles quantités de NGAL sont détectées dans les urines, contrairement à ce qui a été rapporté par Mishra *et al.*, (2003) qui n'en n'observent pas en conditions contrôles chez le rat. Une légère augmentation de l'excrétion urinaire de NGAL est observée dès 12 h après I/R, suivie d'un accroissement jusqu'à 48 h post-I/R où elle atteint des valeurs maximales. Dans l'étude de Mishra *et al.*, (2003), la présence de NGAL urinaire est détecté au cours des 3 premières heures après I/R, et est maximale 24 h post-I/R, qui correspond au terme du protocole expérimental. Nos observations présentent donc certaines différences, d'une part au niveau des valeurs contrôles ainsi qu'en ce qui concerne la cinétique de l'évolution de l'excrétion urinaire de NGAL. Cependant, Mishra *et al.*, (2003) ont détecté les protéines NGAL par Western blot, une méthode qui pourrait présenter une sensibilité différente.

Cette augmentation de l'excrétion urinaire de NGAL pourrait être en relation avec la régulation rapide du gène NGAL dans les cellules épithéliales tubulaires en prolifération. Selon Mishra *et al.*, (2004), la co-localisation de NGAL avec les cellules épithéliales en prolifération suggère que ce dernier pourrait être exprimé par les tubules endommagés afin d'induire une ré-

épithélialisation. Cette hypothèse est soutenue par l'identification récente de NGAL comme étant une protéine capable de transporter le fer, crucial au cours de la croissance et du développement cellulaires (Mishra *et al.*, 2004). Au-delà de son rôle de biomarqueur, le NGAL pourrait donc favoriser la ré-épithélialisation au cours des premières heures post-ischémiques.

D'autres auteurs attribuent également au NGAL un rôle pro-apoptotique (Devireddy *et al.*, 2001). Cette hypothèse pourrait apporter une explication à la différence observée entre les rats WH et les rats WF. Les rats WF, qui présentent un accroissement moindre de l'excrétion urinaire de NGAL, pourraient ainsi présenter moins d'apoptose. Cependant, cette hypothèse est très controversée puisque selon Mishra *et al.*, (2004), le NGAL présenterait au contraire des propriétés anti-apoptotiques. Ces propriétés particulières restent donc à explorer.

2. Inflammation

Au cours de la seconde partie de cette étude, nous avons cherché à observer les séquences d'événements inflammatoires post-ischémiques, plus particulièrement l'évolution de l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T CD-8. L'évolution de la concentration de MCP-1 tissulaire a également été étudiée.

2.1. Dosage MCP-1 et macrophages

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'évolution temporelle de la concentration de MCP-1 dans le cortex, l'OSOM et l'ISOM. Pour rappel, MCP-1 est une chimiokine monocyte-sélective capable de stimuler la migration des monocytes et des macrophages dans le rein après I/R.

Chez les rats WH, une augmentation importante de cette concentration de MCP-1 est observée dès 12 h après I/R, tandis que chez les rats WF, un léger décalage temporel se manifeste, la concentration de MCP-1 n'augmentant fortement que 24 h après I/R. Jo *et al.* (2006) ainsi que Vinuesa *et al.* (2008) rapportent une augmentation importante du taux de MCP-1 tissulaire 24 h après I/R, chez le rat et la souris mais ne se sont toutefois pas intéressés à des périodes plus précoces.

Cet accroissement de la concentration de MCP-1 précède donc l'infiltrat de monocytes/macrophages tel qu'il a été observé dans les testicules par Gerdprasert *et al.* (2002) après induction d'une réaction inflammatoire par injection de LPS. Dans le rein, Hilgers *et al.* (2000) constatent que l'augmentation de MCP-1 est suivie d'une infiltration de macrophages dans les tubules et l'interstitium dès 24 h après I/R. Néanmoins, cet accroissement ne devient significatif qu'à 48 h et atteint des valeurs maximales au jour 7 (Hilgers *et al.*, 2000). Ces données sont donc relativement similaires à celles que nous avons obtenues. Au vu des observations rapportées par Hilgers *et al.* (2000), il s'avérerait donc intéressant d'étudier l'apparition précoce de l'infiltrat de monocytes/macrophages notamment à 12 h et 24 h post-ischémique. Cela permettrait de cibler le moment d'apparition des monocytes/macrophages ainsi que le lien existant entre MCP-1 et l'infiltrat cellulaire.

Selon Jo *et al.* (2006), il semblerait que les macrophages participant à l'infiltration précoce, jouent un rôle délétère dans le développement de l'IRA, notamment via la production de diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, dont MCP-1. Au cours des périodes plus tardives, ils pourraient au contraire participer au processus de régénération et de réparation (Jo *et al.*, 2006). Les macrophages persistants, observés au jour 14, pourraient donc avoir un effet bénéfique en participant à la régénération et à la réparation rénales. A ce sujet, il se pourrait que le NO favorise la mise en place d'un contexte inflammatoire particulier. Ce dernier, associé à un taux de MCP-1 plus faible bien que plus tardif chez les rats WF, pourrait apporter une explication à l'infiltration plus faible de monocytes/macrophages. Au cours des périodes

tardives, les monocytes/macrophages, présents en plus grand nombres chez les rats WF, pourraient participer à la réparation rénale.

Comme constaté par Sung *et al.* (2002), nous observons un taux de MCP-1 tissulaire variable dans les différentes zones du rein. Cela pourrait être dû à des réponses particulières de certains types cellulaires après I/R (Sung *et al.*, 2002). Par ailleurs, Wang *et al.* (2008) ont montré que le MCP-1 est essentiel au recrutement des monocytes/macrophages mais aussi à la génération et à la survie des lymphocytes T CD-8. Ceux-ci ont donc été étudiés dans la seconde partie des processus inflammatoires abordés dans ce travail.

2.2. Comptage CD-8

Les résultats obtenus par les comptages CD-8 mettent en évidence un accroissement lymphocytaire dans l'ISOM, 48 h après I/R, dans les deux souches de rats étudiées. Chez les rats WH s'observe également une augmentation du nombre de lymphocytes CD-8 dans l'OSOM 7 j après ischémie. Ysebaert *et al.* (2000) signalent également cette augmentation dans l'OSOM au jour 7, chez une souche de rats « standard ». Cependant, étant donné le petit nombre d'études portant sur l'évolution des CD-8 après I/R, il est difficile de sélectionner les moments opportuns à étudier. Il pourrait donc s'avérer intéressant d'étudier certains timings compris entre 48 h et 7 jours post-i :r.

Les lymphocytes T CD-8 sont avant tout des cellules cytotoxiques, capables de détruire les cellules présentant des antigènes modifiés ou anormaux. Or, chez les rats WH, le nombre de cellules CD-8 positives est plus important que chez les rats WF dans l'ISOM à 48 h, ainsi que dans l'OSOM et l'ISOM au jour 7. Cette observation pourrait être associée à une destruction tissulaire accrue liée à leur cytotoxicité. Suite à leur nombre plus faible de lymphocytes CD-8, les rats WF seraient alors moins soumis à ces attaques et présenteraient donc moins de lésions.

D'autres études portant sur les néphropathies toxiques constatent également une augmentation des lymphocytes CD-8 dans une région englobant à la fois le cortex et l'OSOM, dès la première période de l'étude à savoir 3 j après la première injection de toxique. Leur nombre s'accroît ensuite et devient maximal au jour 10, au-delà duquel il décline (Pozdzik *et al.*, 2008). De plus, de manière assez surprenante, Pozdzik *et al.* (2008) rapportent que le déclin de lymphocytes CD-8 observé après le jour 10 est suivi d'une réaugmentation au jour 35. Ces observations illustrent l'importance de ces cellules, immédiatement après l'I/R mais également des semaines plus tard, via leur rôle de cellules mémoires (Ascon *et al.*, 2009). Dans le contexte particulier qui nous intéresse, celui de l'IRA post-ischémique, il serait intéressant d'étudier cette population cellulaire à plus long terme, afin d'évaluer si leur présence plus tardive pourrait être mise en relation avec le développement d'une IRC ultérieure.

3. Stress oxydatif

Au cours de la troisième partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'évolution temporelle des processus oxydatifs post-ischémiques, plus particulièrement en ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène et le malondialdéhyde. Notre choix de compléter cette étude *in vivo* par une évaluation des processus oxydatifs se justifie par une publication de Sung *et al.* (2002), qui démontre l'existence d'un lien unissant inflammation et oxydation. En effet, il a été constaté que l'augmentation de l'expression de MCP-1 nécessitait l'activation de NFκB d'une part, mais également la mise en place de phénomènes oxydatifs induits par la reperfusion. Ces observations illustrent l'importance du stress oxydatif post-ischémique ainsi que la nécessité d'étudier simultanément à la fois l'inflammation et le stress oxydatif.

3.1. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Dans un premier temps, l'étude du stress oxydatif a été réalisée en dosant directement l'une des ROS, le H₂O₂. Une augmentation importante de l'excrétion urinaire de H₂O₂ a été observée dès 24 h après I/R, suivi d'un déclin et d'un retour à des valeurs proches des contrôles au jour 7. Aragno *et al.* (2003) rapportent une augmentation rapide (6 h post I/R) du taux d'H₂O₂ urinaire, associée à une diminution de l'activité de certaines enzymes antioxydantes. Cette observation a également été confirmée par Erdogan *et al.* (2006).

D'autres méthodes permettent également d'étudier l'évolution ainsi que le rôle du l'H₂O₂ après I/R. Certains auteurs ont notamment utilisé le tempol, un composé SOD-mimétique capable de réduire la production de H₂O₂ après I/R. C'est ainsi que Chatterjee *et al.* (2000) ont montré qu'une diminution de la production de H₂O₂ consécutive à l'administration de tempol s'accompagnait d'une réduction des lésions au niveau des tubules proximaux.

Ces observations montrent donc bien que l'I/R s'assortit d'une augmentation d'H₂O₂ qui est responsable d'une série d'effets délétères pour le rein. Néanmoins, cette production s'atténue rapidement puisqu'un retour aux valeurs contrôles est observé au jour 7.

Notons que l'évaluation de l'excrétion urinaire de H₂O₂ ne révèle aucune différence entre les deux souches de rats étudiées.

3.2. MDA

Dans la seconde partie de l'étude du stress oxydatif, nous nous sommes intéressés non plus directement à une ROS, mais aux altérations survenant suite à ces attaques oxydatives. Le malonedialdéhyde (MDA) constitue l'un des produits de dégradation des endoperoxydes produits suite au phénomène de peroxydation lipidique. Son augmentation traduit donc une augmentation des altérations membranaires consécutives aux effets des ROS (Irmak *et al.*, 2001).

Une augmentation importante de l'excrétion de MDA a lieu 24 h après I/R. Il semble que cet accroissement du MDA urinaire puisse survenir très rapidement, soit 2 h après la reperfusion du rein (Irmak *et al.*, 2001 ; Erdogan *et al.*, 2006). Le pic de MDA que nous observons 24 h après I/R est ensuite suivi d'une diminution progressive et finalement d'un retour aux valeurs contrôles. Ce type de profil a également été observé dans un modèle de néphropathie toxique induite par le cisplatine. Dans ce cas, l'excrétion urinaire de MDA augmente et culmine 24 h après la première injection du toxique, et diminue ensuite progressivement. Parallèlement à cette mesure, une analyse par Western blot a également permis d'observer une disparition des protéines modifiées par le MDA à partir du jour 3 da,s ce modèle. Les raisons de ces diminutions précoces, tant au niveau de l'excrétion urinaire qu'au niveau des protéines modifiées restent mal comprises. Selon Zhou *et al.* (2006), le MDA est principalement localisé dans le cytoplasme des cellules tubulaires proximales. Or, après intoxication au cisplatine mais également après I/R, surviennent des phénomènes de vacuolisation, de nécroses et de desquamation des ces cellules. L'augmentation de l'excrétion urinaire refléterait donc avant tout les lésions au niveau des cellules épithéliales tubulaires.

Pour ce qui est de la différence observée entre les deux souches, rappelons que les rats WH présentent une augmentation de l'excrétion urinaire de MDA plus importante. Si le MDA peut en effet refléter les altérations tubulaires, ces observations pourraient indiquer que les rats WF présentent proportionnellement moins de lésions que les rats WH.

4. Monoxyde d'azote

Au cours de la quatrième et dernière partie de ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'évolution temporelle de l'excrétion de NO ainsi que sur l'expression des NO synthases après

I/R. Comme dans les parties précédentes, ces expériences ont été réalisées sur deux souches de rats, WH et WF. Or, les WF semblent présenter certaines particularités en ce qui concerne le métabolisme du NO, qui leur conférerait notamment une résistance au développement d'une IRC (Erdely *et al.*). Il s'avérerait donc pertinent de s'interroger sur l'existence des différences similaires entre les deux souches au cours du développement d'une IRA.

4.1. Excrétion urinaire du NO

La mesure de l'excrétion urinaire du NO montre une diminution significative 48 h après I/R, suivie d'un retour progressif aux valeurs contrôles au jour 14. Ces observations concernent aussi bien les rats WH que les rats WF. Or, dans des modèles d'IRC induits par une réduction sévère de la masse rénale ou par administration d'un néphrotoxique, Erdely *et al.*, (2003, 2004) rapportent un maintien de l'excrétion de NO urinaire chez les rats WF. Au contraire, chez les rats Sprague Dawley (SD), une souche équivalente au rat WH, l'IRC s'associe à un déclin de l'excrétion urinaire du NO. Cependant, l'excrétion urinaire de NO ne constitue pas nécessairement un bon indicateur de la production intrarénale de NO. Elle reflète en effet la production globale de NO, tant au niveau vasculaire qu'au niveau d'autres organes, à laquelle le rein ne contribue qu'en proportion mineure (Erdely *et al.*, 2006). Par ailleurs, nos observations dans le cadre de l'IRA post-ischémique n'indiquent aucune différence significative d'excrétion urinaire du NO entre les rats WH et les rats WF. Chez ces derniers, les altérations plus aiguës de la fonction rénale suivies d'une meilleure récupération morpho-fonctionnelle ne s'expliquent donc pas uniquement par des modifications de l'excrétion urinaire de NO.

Au cours de la suite de leurs travaux, Erdely *et al.* (2006) ont constaté que d'autres facteurs étaient probablement impliqués dans la résistance au développement de l'IRC observée chez les rats WF. En effet, au-delà du maintien de l'excrétion urinaire de NO observée chez les rats WF après une IRC, ou de sa diminution dans le cadre de l'IRA post-ischémique, cette résistance pouvait également être liée à la pression artérielle. En effet, il semble que les rats WF présentent une pression artérielle plus faible que les rats WH. Or, l'hypertension glomérulaire constitue le premier facteur de risque de lésions rénales. Chez les rats WF, l'inhibition des NOS et donc la chute du NO, s'accompagne d'une très faible augmentation de la pression sanguine dans les capillaires glomérulaires, tandis que chez les rats WH, au contraire, elle augmente de manière drastique. Par ailleurs, l'inhibition des NOS couplée à une réduction sévère de la masse rénale ou à l'administration d'un néphrotoxique rend les rats WF susceptibles de développer une IRC au même titre que les rats WH. La pression artérielle ainsi que tension sanguine et la production de NO sont donc deux facteurs étroitement liés et probablement impliqués dans la meilleure récupération post-ischémique observée chez les rats WF.

4.2. Expression et régulation des NO synthases

La réduction de l'excrétion urinaire du NO que nous avons observée 48 h après I/R peut être mise en relation avec une diminution de l'abondance des NO synthases ou de leur activité. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier dans un premier temps l'évolution de l'expression de ces enzymes après I/R. Par la suite, il serait intéressant d'étudier l'évolution de leurs niveaux d'activité enzymatique après I/R.

4.2.1. NOS2

Nos observations montrent qu'une augmentation importante de l'expression de la NOS2 (ou iNOS) dans l'OSOM et l'ISOM se produit 48 h après I/R chez les rats WH, avant de s'atténuer. Chez les rats WF, l'augmentation est progressive dans l'OSOM et plus aiguë dans l'ISOM 48 h après l'I/R. De manière générale, il apparaît que l'expression de la iNOS est toujours plus élevée chez les rats WH que chez les rats WF. Or, Noiri *et al.* (2001) ont démontré l'effet délétère de

l'induction de la iNOS après I/R. Cela a d'ailleurs été confirmé chez des souris déficientes en iNOS qui semblent être résistantes à l'IRA post-ischémique (Guan *et al.*, 2006). Ces observations attribuent donc au NO produit par la iNOS un rôle cytotoxique, notamment de par sa capacité à du peroxy-nitrite en s'associant à l'anion superoxyde (Guan *et al.*, 2006 ; Noiri *et al.*, 2001).

D'autres études menées sur des tubules proximaux isolés ont montré qu'une délétion en iNOS, l'isoforme inductible de la NO synthase, conférait aux cellules une résistance à l'hypoxie (Ling *et al.*, 1998). Au contraire, une délétion en eNOS ou en nNOS, isoformes constitutives, était à l'origine de dommages létaux lors de l'exposition des cellules à un même degré d'hypoxie (Ling *et al.*, 1998). Ces résultats appuient donc l'hypothèse du rôle délétère de la iNOS, bien que les différences fonctionnelles observées entre les trois isoformes restent mal comprises. Selon certains auteurs, une différence importante constatée entre l'isoforme inductible et les isoformes constitutives concerne la durée de libération du NO, qui varie de quelques minutes pour les formes constitutives à plusieurs heures pour la forme inductible. Or, une exposition prolongée au NO entraîne une inhibition des enzymes du complexe 1 de la chaîne respiratoire, conduisant à une diminution de la concentration cellulaire en glutathion réduit, un antioxydant puissant (Clementi *et al.*, 1998).

4.2.2. NOS3

Dans l'OSOM, nos résultats indiquent une augmentation de l'expression de la NOS3 ou eNOS au jour 7, suivie d'un retour aux valeurs contrôles chez les rats WH. Chez les rats WF, une expression plus importante se produit au jour 7, et se maintient sensiblement jusqu'au jour 14. Dans l'ISOM, l'évolution de l'expression de la eNOS se caractérise par une diminution précoce, qui est suivie d'un retour aux valeurs contrôles au jour 14, tant chez les rats WH que chez les rats WF. Selon Szabo *et al.* (2003) et Erdely *et al.* (2007), l'abondance de la eNOS varie de manière importante en fonction du modèle expérimental utilisé. C'est ainsi que dans un modèle d'IRC induit par réduction de la masse rénale, aucun changement d'expression de la eNOS n'est observé, tandis que dans d'autres conditions physiopathologiques, une augmentation ou une réduction de cette expression peut se produire (Erdely *et al.*, 2007). Ces observations suggèrent que les variations de l'expression de la eNOS seraient en fait secondaires aux types de lésions induites dans le modèle considéré (Erdely *et al.*, 2006).

Etant donné qu'à notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été réalisée dans le cadre de l'IRA post-ischémique, il s'avère difficile de tirer des conclusions sur base de ces observations. Néanmoins, étant donné qu'aucun rôle délétère n'est attribué à la eNOS, nous pensons qu'un meilleur maintien de son expression s'avère probablement bénéfique. Or, une augmentation légèrement plus importante de son expression se produit dans l'OSOM des rats WF, ce qui pourrait contribuer à une fonction rénale post-ischémique moins altérée.

5. Conclusions et perspectives

L'objectif de ce mémoire était donc de participer à un projet de recherche s'intéressant aux mécanismes physiopathologiques de l'IRA consécutive à un épisode d'ischémie/reperfusion, et plus particulièrement l'implication du stress oxydatif, nitrosatif et inflammatoire dans ces mécanismes (thèse de doctorat en cours).

La première étape a consisté à caractériser la fonction rénale après I/R chez les rats WH et les rats WF. Toutes ces expériences, bien que préliminaires, nous permettent de tirer certaines conclusions. En effet, nos résultats montrent des divergences au niveau des adaptations de la fonction rénale entre les deux souches. Dans un premier temps, les rats WF présentent en effet des modifications plus importantes des capacités excrétoires mais se normalisent ensuite plus

rapidement. Ces observations pourraient traduire une meilleure adaptation du rein post-ischémique chez ces animaux.

Les expériences menées nous ont également permis de constater que les processus oxydatifs semblent précoces et temporaires alors que les processus inflammatoires semblent s'étendre sur une période beaucoup plus longue. Cependant, comme nous l'avons mentionné de nombreuses fois au cours de ce mémoire, l'ensemble de ces phénomènes sont en interaction, et ne peuvent donc être dissociés. A l'avenir, il pourrait s'avérer intéressant de cibler plus particulièrement certains timings clés propres, importants pour certains types cellulaires. Une action pharmacologique éventuelle pourrait ensuite être envisagée, de manière à cibler les molécules essentielles au développement de la réaction inflammatoire ainsi que de mettre en évidence ses effets bénéfiques ou néfastes.

L'utilisation d'agents pharmacologiques capable d'inhiber spécifiquement la production de ROS ou la mise en place d'une réaction inflammatoire pourrait aussi nous permettre d'étudier la contribution de chacun de ces mécanismes au développement de l'IRA. Cependant, étant donné leur complexité ainsi que la difficulté d'inhiber totalement l'une de ces voies, ce type d'étude pourrait s'avérer difficile à mettre en œuvre *in vivo*.

Tout au long de cette étude, nous avons constaté certaines différences entre les souches de rats, en ce qui concerne les processus inflammatoires et oxydatifs d'une part, et l'expression des NO synthases d'autre part. En effet, une expression plus importante de la NOS2 inducible a été observée chez les rats WH, alors que dans l'OSOM, l'expression de la NOS3 constitutive était plus élevée chez les rats WF. Ces observations pourraient suggérer qu'une expression accrue de la NOS3 après I/R, associée à une induction minimale de la NOS2, pourrait s'avérer protectrice. Si tel est le cas, les rats WF pourraient constituer un bon modèle d'étude de l'implication du NO dans certains processus physiopathologiques. Cependant, des études complémentaires ciblant les altérations de l'expression de la NOS2 et NOS3 dans le cortex devraient également être réalisées. Par ailleurs, l'étude de l'expression de la NOS1 devrait également être envisagée. Des études immunohistochimiques nous ont permis de constater que cette dernière se retrouve essentiellement au niveau de la macula densa, structure impliquée dans la régulation du DFG. Il serait donc également intéressant de quantifier l'expression de la NOS1, plus particulièrement dans le cortex. Cette étude de l'expression des NOS devrait finalement être complétée par l'évaluation de leur activité enzymatique.

Si la suite de ces expériences permet de confirmer que les rats WF constituent en effet un bon modèle d'étude de l'implication du NO dans le développement de l'IRA, une évaluation hémodynamique *in vivo* pourrait s'avérer particulièrement intéressante, en caractérisant notamment le dysfonctionnement endothélial et la balance des facteurs vasoactifs. Pour ce faire, une approche pharmacologique devrait permettre de compléter les données obtenues en conditions physiologiques et physiopathologiques.